

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 8 月 28 日 (28.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/070932 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/00, 5/10, C12Q 1/68,  
G01N 33/50, 33/15, A61K 31/7105, 38/00, A01K 67/027,  
A01H 5/00, C12N 5/10 // (C12R 1/91)

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/01913

(22) 国際出願日: 2003 年 2 月 21 日 (21.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-46889 2002 年 2 月 22 日 (22.02.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚  
製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒101-8535 東京都千代田区神田司町  
2 丁目 9 番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 幹生  
(SUZUKI, Mikio) [JP/JP]; 〒771-0125 徳島県徳島市川  
内町金岡 4 0 番地の 1 Tokushima (JP). 百田 裕 (MO-  
MOTA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒771-0219 徳島県板野郡松  
茂町笹木野字山南 1 6 番地の 3 2 Tokushima (JP). 渡  
邊 武 (WATANABE, Takeshi) [JP/JP]; 〒770-0941 徳島  
県徳島市万代町 5 丁目 5 3 番地の 1 Tokushima (JP).(74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒  
541-0045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜  
T N K ビル Osaka (JP).

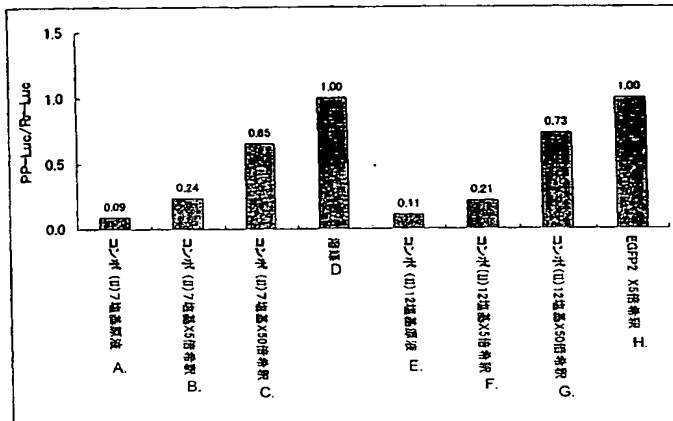
(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, SI, SK, TR).

[続葉有]

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE FOR TARGET GENE

(54) 発明の名称: 標的遺伝子用ポリヌクレオチド



A...COMPO (II) 7-BASES STOCK SOLUTION  
 B...COMPO (II) 7-BASES 5-FOLD DILUTION  
 C...COMPO (II) 7-BASES 50-FOLD DILUTION  
 D...SOLVENT  
 E...COMPO (II) 12-BASES STOCK SOLUTION  
 F...COMPO (II) 12-BASES 5-FOLD DILUTION  
 G...COMPO (II) 12-BASES 50-FOLD DILUTION  
 H...EGFP2 5-FOLD DILUTION

(57) Abstract: It is intended to provide a single-stranded polynucleotide sequence which comprises a nucleic acid sequence of a complementary strand to the target gene and component sequences.

(57) 要約:

本発明は、標的遺伝子と相補鎖核酸配列とコンポーネント配列からなる一本鎖ポリヌクレオチド配列を提供する。

## 明細書

## 標的遺伝子用ポリヌクレオチド

## 技術分野

本発明は、標的遺伝子に特異的なRNA機能抑制活性を有する一本鎖ポリヌクレオチド配列及び該ポリヌクレオチド配列を用いる標的遺伝子の機能抑制法に関する。

## 背景技術

RNA干渉法(RNAインターフェアランス: RNA interference)は、標的とする遺伝子(以下、標的遺伝子)と相同配列を有する2本鎖RNA、つまり1本のRNAは標的遺伝子に対するセンス配列を有し、別の1本のRNAは標的遺伝子に対するアンチセンス配列を有する、2つの相補的なRNAから構成されている2本鎖RNAを細胞内に導入することにより、標的遺伝子の転写産物(RNA)が破壊される現象に基づく方法である(Fire, A., et al., Nature, 391, 806-811 (1998))。本明細書では、2本の別々の相補的分子がアニールする場合を2本鎖、1本の分子内で相補的部分がアニールしているか、2本の別々の相補的分子がアニールしているかを区別せずに使用する場合を2重鎖とよぶ。その遺伝子抑制効果および特異性はアンチセンス法より高く、有効濃度はより低いことが明らかとなっている。無脊椎動物においては2重鎖RNAの構造、特にその長さには制限がなく、2重鎖部分が長いほど有効度が高く、30塩基対を超える2重鎖RNAを用いた時も遺伝子特異的なRNAインターフェアランス現象を生じることが知られている。一方、脊椎動物においては、30塩基対を超えるような2重鎖部分を有する長鎖2本鎖RNAの導入はインターフェロン系を活性化し、標的遺伝子以外の広範な遺伝子の非特異的な遺伝子機能抑制(RNAの非特異的な分解、mRNAの非特異的な翻訳の抑制)および細胞死等を生じることが知られており、RNAインターフェアランス現象を利用した遺伝子機能抑制に関しては限定的な効果が得られているに過ぎなかった。

長鎖2重鎖RNAは細胞内で約21ヌクレオチド長の小型RNAからなる2本鎖RNAである小型干渉性RNA(small interference RNA(以下、siRNAと略称する))に切断されて標的遺伝子抑制活性を有する分子として機能することが

明らかにされ、ツッシュルら (Tuschl, T.) らは標的遺伝子と相同性を有する si RNA を哺乳類細胞に導入することにより、インターフェロン系の活性化を引き起こさずに、RNA インターフェアランス効果を生み出せることを証明した (Elbashir, S.M., et al., Nature, 411, 494-498 (2001))。これら si RNA は長鎖 2 重鎖 RNA と異なりインターフェロン系を活性化しないことに加えて、約 20 ヌクレオチド長の部分で相補的なある特定の遺伝子のみをより特異的に抑制できる点で優れている。この従来技術は、哺乳類における効率的な遺伝子機能抑制系の発見であり、医薬品開発および遺伝子医薬の可能性を広げた。

本発明者らは、上記 si RNA による標的 RNA 分解を介した RNA 遺伝子機能抑制の医薬品標的遺伝子スクリーニング、ノックダウンマウス作製による医薬品標的遺伝子のインビボ評価、遺伝子疾患に対する医薬組成物（遺伝子治療剤）へのより効率のよい適用を考え鋭意研究を行った。

上記目的を達成するには、合成 RNA だけではなく、DNA プラスミドベクターから si RNA を転写する構造を有することが重要であるが、2 つの異なる短鎖 RNA を発現させること、そしてそれらを細胞内でアニールさせ標的とする細胞内において RNA インターフェアランス効果を発揮させること、は難しいと考えられた。

本発明者らは、鋭意研究の結果、はたして小型 2 本鎖 RNA に代えて、標的遺伝子に相補する短鎖ポリヌクレオチドと前記ポリヌクレオチドに相補的な短鎖ポリヌクレオチドとの間に任意のコンポーネントを有するポリヌクレオチド配列からなる一本鎖ポリヌクレオチドを用いて、該一本鎖ポリヌクレオチドを細胞に導入し、標的遺伝子の活性を検討したところ該活性を抑制することが判明しここに発明を完成した。

本発明の目的は、標的遺伝子から転写される RNA を特異的に分解する、またはその翻訳を選択的に抑制することによって、目的とする RNA またはタンパク質の機能発現を抑制制御することが可能な一本鎖ポリヌクレオチドならびに該一本鎖ポリヌクレオチドによってその標的遺伝子の機能を抑制制御する方法を提供することにある。本発明によれば、簡便な遺伝子の機能解析方法、医薬品標的遺伝子を含む機能的遺伝子のスクリーニング方法、ノックダウンマウス作製等の遺

伝子組換え動物、または遺伝子組換えウイルスを用いた医薬品標的遺伝子のインビボ評価方法、遺伝子疾患、感染症を含む疾患に対する医薬組成物（遺伝子治療剤）、ノックダウンブタ等を用いた移植用臓器産生動物を提供することが可能となる。

#### 5 図面の簡単な説明

図1は、本発明標的遺伝子用ポリヌクレオチドによるRNA機能抑制効果を示す。

図2は、Lamin A/C 遺伝子機能抑制ベクターによるRNA機能抑制効果を示す。

図3は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子機能抑制ベクターのRNA機能抑制効果を示す。

#### 10 発明の開示

即ち、本発明によれば、連続する(I)+(I I)+(I I I)のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列であって、(I)または(I I I)のコンポーネントのいずれかに相補するRNAに対してRNA機能抑制活性を有する標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、但し、コンポーネント(I I I)は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する15～30または18～25  
15 のポリヌクレオチド配列、コンポーネント(I I)は、0塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列（但し、0塩基は結合を表す）、または非ヌクレオチド配列、コンポーネント(I)は、コンポーネント(I I I)に相補的な配列を含むポリヌクレオチド配列、または前記の連続する15～30、または18～25のポリヌ  
20 レオチドからなるヌクレオチド配列がDNAまたはRNAを含むものである標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を提供することができる。

また、本発明によれば、前記(I)または(I I I)のコンポーネントのポリヌクレオチド配列及び/または相補的ポリヌクレオチドが1から数塩基のU、T、G、CまたはAからなる配列を少なくとも何れかの末端にさらに有するか、相補的配  
25 列の内部において欠失、置換又は付加している標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を提供することができる。標的遺伝子は、mRNAを含むタンパク質をコードするRNA、tRNA、rRNA、Xist、アデノウイルスVA RNAを含むタンパク質をコードしない機能的RNA、ウイルスゲノムRNAであってもよい。

さらに、本発明によれば、上記ポリヌクレオチド配列が化学的合成法または遺伝子組換え技術によって得られる一本鎖ポリヌクレオチド配列であって、配列番号 1 または 2 の一本鎖 RNA からなる標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列が提供できる。

- 5    また、本発明によれば、前記一本鎖 RNA からなる標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント (I I) がヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列のいずれか、またはそれらの組み合わせによってなる標的遺伝子用配列、前記コンポーネント (I I) のヌクレオチド配列が 1 塩基以上 10 キロ塩基未満、1 塩基長から数百塩基長（例えば、700 塩基、500 塩基または 300 塩基）のヌ
- 10   クレオチド配列、1 塩基長から数十塩基長（例えば 70 塩基、50 塩基、30 塩基）のヌクレオチド配列からなる標的遺伝子用配列、1 塩基長から 20 塩基長のヌクレオチド配列、または配列番号 3 または 4 に示されるコンポーネント (I I) からなる標的遺伝子用配列が提供される。また、本発明によれば、前記のコンポーネント (I I) のヌクレオチド配列または非ヌクレオチド配列が、PNA、細胞
- 15   質移行性配列、デコイ活性を有する配列、インターフェロン誘導抑制配列、RNAase 抑制活性、アンチセンス活性、リボザイム活性およびトランスファー RNA のいずれかを有する配列、またはそれらの組み合わせからなる前記標的遺伝子用配列が提供される。

- 本発明によれば、上記標的遺伝子用配列または該標的遺伝子用配列が組換えベ
- 20   クターに挿入された組換えベクター、該組換えベクターの製造方法が提供される。

また、本発明によれば前記の標的遺伝子用配列を用いて、医薬品標的遺伝子または有用な機能を有する遺伝子をスクリーニングする方法が提供される。

- さらに本発明によれば前記の標的遺伝子用配列、または組換えベクターを有効成分とする医薬組成物または医薬組成物からなる遺伝子治療剤を提供することが
- 25   できる。

また、本発明によれば、以下の工程を含む標的遺伝子用ヌクレオチドの合成方法：

- (i) コンポーネント (I I) の3'末端の数ヌクレオチドがコンポーネント (I) または (I I) の数ヌクレオチドに相補的になるようにコンポーネント (I) および (I I) からなる一本鎖ヌクレオチドを作製する工程、
- (ii) このコンポーネント (I) および (I I) からなる一本鎖ヌクレオチドを用いてヌクレオチド合成酵素活性によりコンポーネント (I I I) を合成させる工程、またはこのコンポーネント (I) および (I I) からなる一本鎖ヌクレオチドを用いて細胞内に導入し細胞内に存在する上記ヌクレオチド合成酵素活性によりコンポーネント (I I I) を合成させる工程が提供される。
- 10 また、本発明によれば、コンポーネント (I) および (I I I) がランダムなオリゴヌクレオチドである前記方法により得られたランダム化標的遺伝子用ヌクレオチドが提供される。
- 本発明によれば、細胞または組織において、連続する (I) + (I I) + (I I I) のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を
- 15 該細胞または該組織に導入し、前記 (I) または (I I I) のコンポーネントのいずれかに相補的な配列を有するRNAに対してRNA機能抑制活性を有することによって標的遺伝子の機能を抑制する方法、
- 但し、コンポーネント (I I I) は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する 15 ~ 30 または 18 ~ 25 のポリヌクレオチド配列、コンポーネント (I I) は、
- 20 1塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列、コンポーネント (I) は、コンポーネント (I I I) に相補的配列を含むポリヌクレオチド配列、または前記の連続する 15 ~ 30、または 18 ~ 25 のポリヌクレオチドからなるヌクレオチド配列がDNAまたはRNAを含むものである
- が提供される。
- 25 また、本発明によれば、前記 (I) または (I I I) のコンポーネントのいずれかの配列が1から数塩基のU、T、G、CまたはAが少なくとも何れかの末端に有するか、内部において欠失、置換又は付加している標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列である標的遺伝子の機能を抑制する方法を提供することができる。

さらに、本発明によれば、上記ポリヌクレオチド配列が化学的合成法または遺伝子組換え技術によって得られる一本鎖ポリヌクレオチド配列であって、配列番号 1 または 2 の一本鎖 RNA からなる標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列である標的遺伝子の機能を抑制する方法が提供できる。

- 5    また、本発明によれば、前記標的遺伝子の機能を抑制する方法に用いられる一本鎖 RNA からなる標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント (I I) がヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列のいずれか、またはそれらの組み合わせによってなる標的遺伝子用配列、前記コンポーネント (I I) のヌクレオチド配列が 1 塩基以上 10 キロ未満、1 塩基長から数百塩基長（例えば、7  
10   00 塩基、500 塩基または 300 塩基）のヌクレオチド配列、1 塩基長から数十塩基長（例えば 70 塩基、50 塩基、30 塩基）のヌクレオチド配列からなる標的遺伝子用配列、1 塩基長から 20 塩基長のヌクレオチド配列、または配列番号 3 または 4 に示されるコンポーネント (I I) からなる標的遺伝子用配列を用いる方法が提供される。
- 15   また、本発明によれば、前記のコンポーネント (I I) のヌクレオチド配列または非ヌクレオチド配列が、PNA、細胞質移行性配列、デコイ活性を有する配列、インターフェロン誘導抑制配列、RNAse 抑制活性、アンチセンス活性、リボザイム活性、トランスファー RNA を有する配列、のいずれか、またはそれらの組み合わせからなる前記標的遺伝子用配列を用いる標的遺伝子の機能を抑制する  
20   方法が提供される。標的遺伝子は、mRNA を含むタンパク質をコードする RNA、tRNA、rRNA、Xist、アデノウイルス VA RNA を含むタンパク質をコードしない機能的 RNA、ウイルスゲノム RNA であってもよい。

さらに本発明によれば、前記コンポーネント (I I I) の連続する 15 ~ 30、または 18 ~ 25 のポリヌクレオチドからなるヌクレオチド配列が DNA または  
25   RNA を含むものである標的遺伝子の機能を抑制する方法、または前記コンポーネント (I) または (I I I) の配列が 1 から数塩基の U、T、G、C または A が少なくとも何れかの末端に有するか、内部において欠失、置換又は付加している標的遺伝子の機能を抑制する方法、前記ポリヌクレオチド配列が化学的合成法また

は遺伝子組換え技術によって得られる標的遺伝子の機能を抑制する方法が提供される。

また、本発明によれば、配列番号 1 または 2 の一本鎖 RNA を用いる標的遺伝子の機能を抑制する方法が提供される。

- 5    さらに本発明によれば、前記標的遺伝子の機能を抑制する方法において、標的遺伝子用配列のコンポーネント (I I) がヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列のいずれか、またはそれらの組み合わせによってなり、該コンポーネント (I I) のヌクレオチド配列が 1 塩基以上 10 キロ未満、1 塩基長から数百塩基長、1 塩基長から数十塩基長のヌクレオチド配列からなる標的遺伝子用配列、1 塩基長から 20 塩基長のヌクレオチド配列、または配列番号 10    3 または 4 に示されるコンポーネント (I I) からなる標的遺伝子用配列である方法が提供される。

- また、本発明によれば、前記のコンポーネント (I I) のヌクレオチド配列または非ヌクレオチド配列が、PNA、細胞質移行性配列、デコイ活性を有する配列、15    インターフェロン誘導抑制配列、RNAse 抑制活性を有する配列、アンチセンス活性を有する配列、リボザイム活性を有する配列およびトランスファー RNA 活性のいずれかを有する配列、またはそれらの組み合わせからなる前記標的遺伝子用配列を用いる標的遺伝子の機能を抑制する方法が提供される。

- さらに本発明によれば、標的遺伝子から転写される RNA または標的遺伝子 20    である RNA を特異的に分解する、またはその翻訳を選択的に抑制することによって、目的とする RNA またはタンパク質の機能発現を抑制する方法、または標的遺伝子の特異的に分解する方法によって、標的遺伝子の発現を抑制する方法、前記いずれかの方法によって、産生した培養されたノックダウン細胞または組織または非ヒト動物または植物を提供することができる。また本発明によれば、細胞または組織または非ヒト動物または植物において、連続する (I) + (I I) + 25    (I I I) のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を該細胞または該組織または該非ヒト動物または該植物に導入し、前記 (I) または (I I I) のコンポーネントのいずれかに相補する配列を有する RNA に対して RNA 機能抑制活性を有することによって標的遺伝子の機能を試験する



方法や、被検化合物を細胞または組織と共に培養した後、該細胞または組織に対して、連続する(I)+(I I)+(I I I)のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を該細胞または該組織に導入し、前記(I)または(I I I)のコンポーネントのいずれかに相補するRNAに対してRNA機能抑制活性を、コントロールと比較して標的遺伝子の機能阻害を促進する候補化合物を検出する方法を提供することができる(但し、コンポーネント(I I I)は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する15~30または18~25のポリヌクレオチド配列、コンポーネント(I I)は、1塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列、コンポーネント(I)は、コンポーネント(I I I)に相補的配列を含むポリヌクレオチド配列、または前記の連続する15~30、または18~25のポリヌクレオチドからなるヌクレオチド配列がDNAまたはRNAを含むものである標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列である)。

また、本発明によれば、細胞または組織または非ヒト動物または植物において、連続する(I)+(I I)+(I I I)のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を該細胞または該組織または該非ヒト動物または該植物に導入し、前記(I)または(I I I)のコンポーネントのいずれかに相補するRNAに対してRNA機能抑制活性を有することによって標的遺伝子の機能相互作用物のスクリーニング方法が提供できる(但し、コンポーネント(I I I)は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する15~30または18~25のポリヌクレオチド配列、コンポーネント(I I)は、1塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列、コンポーネント(I)は、コンポーネント(I I I)に相補的配列を含むポリヌクレオチド配列、または前記の連続する15~30、または18~25のポリヌクレオチドからなるヌクレオチド配列がDNAまたはRNAを含むものである標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列である)。

本発明によれば、細胞または組織または非ヒト動物または植物において、連続する(I)+(I I)+(I I I)のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を該細胞または該組織または該非ヒト動物または該

植物に導入し、前記(I)または(I I I)のコンポーネントのいずれかに相補するRNAに対してRNA機能抑制活性を有することによって標的遺伝子の関連する機能を刺激または抑制する化合物を同定するためのスクリーニング法であって;

- (a) 候補化合物と、該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物(または該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物を担持している細胞もしくはその膜)またはその融合タンパク質との結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合させた標識により測定する方法、
- 10 (b) 候補化合物と、該一本鎖ポリヌクレオチド配列が導入された細胞(または該一本鎖ポリヌクレオチド配列を担持している細胞もしくはその膜)またはその融合物との結合を、標識競合物質の存在下で測定する方法、
- (c) 候補化合物が該一本鎖ポリヌクレオチド配列により、標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは該標的遺伝子発現産物の活性化または抑制により生ずるシグナルをもたらすか否かを、前記ポリペプチドまたは
- 15 標的遺伝子発現産物を担持している細胞または細胞膜に適した検出系を用いて調べる方法、
- (d) 候補化合物と、標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物を含有する溶液とを同時に混合して混合物を調製し、該混合物中の該ポリペプチドまたは該標的遺伝子発現産物の活性を測定し、
- 20 該混合物の活性をスタンダードと比較する方法、および
- (e) 候補化合物が細胞における該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするmRNAおよび該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドの産生に及ぼす効果を検出する方法よりなる群から選択される方法を含んでなるスクリーニング法(但し、コンポーネント(I I
- 25 I)は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する15~30または18~25のポリヌクレオチド配列、コンポーネント(I I)は、1塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列、コンポーネント(I)は、コンポーネント(I I I)に相補的配列を含むポリヌクレオチド配列、または前記の連続する15~30、または18~25のポリヌクレオチドからなるヌクレオチ

ド配列がDNAまたはRNAを含むものである標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列である)を提供することができる

以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、  
5 「塩基配列またはアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)および当該分野における慣用記号に従うものとする。また、DNAの合成、外因性遺伝子  
10 含有するベクター(発現ベクター)の製造、該ベクターによって形質転換された宿主細胞及び宿主細胞が分泌する発現蛋白の製造方法などは、一般的遺伝子工学的  
15 的手法により容易に製造・取得することができる [Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) など参照]。

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「uGL 3. 1 2 RNA」および「uGL 3. 7 RNA」と名付けられた標的遺伝子用ポリヌ  
15 クレオチド配列から演繹されるものを挙げるることができる。その塩基配列は、配列番号: 1 および 2 に示されるとおりである。

該ポリヌクレオチド配列は、配列番号: 1 に示される 52 のポリヌクレオチド配列の新規な標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列であり、コンポーネント(I)が  
19 オリゴヌクレオチド、コンポーネント(II)が 12 のオリゴヌクレオチド、  
20 そしてコンポーネント(III)が 21 のオリゴヌクレオチド配列からなっている。  
また、配列番号: 2 に示される 45 のポリヌクレオチド配列の新規な標的遺伝子  
用ポリヌクレオチド配列であり、コンポーネント(I)が 19 オリゴヌクレオチド、  
コンポーネント(II)が 7 のオリゴヌクレオチド、そしてコンポーネント(III  
1)が 21 のオリゴヌクレオチド配列からなっている。

25 尚、本発明において遺伝子は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNA、または2本鎖ならびに1本鎖のRNAを包含する趣旨であり、またその長さは何ら制限されるものではない。  
従って、本発明の遺伝子には、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNA、およびcDNAを含む1本鎖DNA(センス鎖)、並びに該センス

鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（アンチセンス鎖）、およびウイルスゲノムを含むRNAおよびそれらの断片のいずれもが含まれる。

本発明において遺伝子とは、リーダ配列、コード領域、エキソン、イントロンを含む。ポリヌクレオチドは、RNA、DNA、PNA (peptide nucleic acid) 等を例示できる。DNAは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAを含み、RNAは、mRNA、tRNA、rRNA、UsnRNA (uridine-rich small nuclear RNA)、ウイルスゲノム、ウイルスmRNA、5sRNA、トランスファーRNA、リボザイムおよび上記PNA、または天然型ヌクレオチドと相補的結合が可能なポリアミン等も含み、特定アミノ酸配列を有するポリペプチドは、  
10 その断片、同族体、誘導体、変異体を含む。

変異体は、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、欠失、置換、付加、および挿入された変異体；コードされるポリペプチドの機能を実質的に変更しないポリヌクレオチド配列を意味する。

尚、これらアミノ酸配列の改変（変異等）は、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じることもあるが、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）を利用して人為的にこれを行なうこともできる。  
15

上記ポリペプチドは、アレル体、ホモログ、天然の変異体で少なくとも90%、好ましくは、95%、より好ましくは98%、さらにより好ましくは99%相同なものを含む。

20 本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列とは、3つのコンポーネントから構成されるヌクレオチドまたは非ヌクレオチド配列を有する一本鎖からなる配列として、該コンポーネントは連続してコンポーネント(I)+コンポーネント(II)+コンポーネント(III)の順序で連なる一本鎖からなるポリヌクレオチド配列として定義される。

25 上記3つのコンポーネントからなる一本鎖からなるポリヌクレオチド配列は、各コンポーネントが独立して作られた後、接合されるか、あるいは一つの構成要件として作られてもよい。上記標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列は、化学的合成されるか、または遺伝子組換え技術を用いて作られてもよい。これら技術は当業界において一般に用いられる方法で当業者であれば、十分に目的とする標的遺

伝子用ポリヌクレオチド配列を得て、単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を得ることができる。上記においてDNAの合成は、ホスホルアミダイト法またはトリエステル法による化学合成によることもでき、市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置上で行うこともできる。また、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を増幅させるか、発現ベクターに入れるために必要な二本鎖断片は、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖を共にアニーリングさせるか、または適当なプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを用い相補鎖を付加するかによって、化学合成した一本鎖生成物から得ることもできる。

合成されたRNAまたはDNAは、PAGEまたは陰イオン交換HPLCなどで精製することができる。

また、RNAの合成は2'に水酸基を有するためDNA合成に比べて合成が難しく、その合成には2'に保護基を必要とし、生成後の脱塩・脱保護で収量が大幅に減ったり、鎖の安定性を失ったりすることも考えられるが、2'の保護にorthoester(2'-ACE)を用いる事により、安定したRNA合成を行なうことも可能で、該方法はDharmacon社の2'-ACE合成RNAオリゴヌクレオチドとして、2'を保護した後、使用時に揮発性バッファーを使用することにより、容易に脱塩・脱保護を行なうことができる(<http://dharmacon.com/sirna.html>)。また、RNAの合成は市販のApplied Biosystems社製ABI 3900ハイスループットDNA合成器等とともにRNA合成用試薬を用いてホスホロアミダイト法により合成することもできる。

さらに、目的とするポリヌクレオチドの合成は、例えば被保護リボヌクレオチド・ホスホラミダイト法、前記2'-ACE法および好適なデオキシリボ核酸/RNA合成機を用いて、好ましくは、化学合成される。前記ポリヌクレオチドの合成は、市販のデオキシリボ核酸/RNA合成機と該機器に付属の使用説明書に  
25 順じ、自身で合成してもよく、或いは、この種のポリヌクレオチドの合成を受託している会社、または部門に合成を委託することも当業界では容易である。前記委託先は、例えば、Dharmacon Research社(Lafayette, CO, USA)、ジェンセット・オリゴス(Genset Oligos社：<http://www.gensetoligos.com/>)、Ambion社、Xeragon(<http://www.xeragon.com>)、Peribio Science社(<http://www.perbio.co>)

m/)、ChemGenes 社(<http://www.chemgenes.com>)等により、デオキシリボ核酸/RNA合成を行なうことができる。

上記本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列の取得方法は、[Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); 同 100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984); 続生化学実験講座 1 「遺伝子研究法 II」、日本生化学会編, p105 (1986)] などの遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段 [J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); 同 91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); 同 24, 245 (1983)] およびそれらの組合せ方法などが例示できる。

また、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント(I)または(II)は、標的とする遺伝子のRNAに一部または全部が相補するものであればよく、標的とするRNAは、mRNA、tRNA、rRNA、ウイルスゲノム、ウイルスmRNA、XistRNAなど哺乳動物を含む細胞に存在しているRNA全てを対象にすることができる。かくして、標的遺伝子のRNAと相補する部分を含むコンポーネント(III)は、連続する15から30のポリヌクレオチド配列、好ましくは18から25のポリヌクレオチド配列、より好ましくは、19から21の長さからなるポリヌクレオチド配列がよい。また、コンポーネント(III)の一部または全部が相補する標的として選択される遺伝子領域は、該遺伝子をコードする開始コドンから50から100塩基下流となるエキソン部位が好ましく選択され、5' および3' UTRsを避けるのがよい。また標的遺伝子の相補部位の配列の特異性が高いことがより好ましい。また、選択される領域としては該領域中において、50%程度のGまたはCを含んでいるAA(N19)TTという配列領域が選択されるコンポーネント(III)の一部または全部が相補する領域として例示できる。前記のような配列が見つからないケースにおいては、末端部位をAA(N21)もしくはCA(N21)として代用することもできる。

また、上記コンポーネント(III)はRNAであってもDNAであってもよい。

上記本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント (I I I) の標的遺伝子の相補する領域の決定は、NCBIのblastサーチによって実施、決定することができる。または任意の配列になるように合成されたコンポーネント (I I I) を用いて、標的遺伝子の機能を抑制するポリヌクレオチド配列 5 を選択し、本発明の用途に使用することもできる。

また、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント (I) は、コンポーネント (I I I) の配列に相補する配列であるか、コンポーネント (I I I) の配列に50%超相補的であり、標的として選択される遺伝子領域にコンポーネントの (I I I) の配列と同じく相補的であってもよい。さらに本発明の 10 標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント (I I I) は、コンポーネントの (I) の配列長より、1若しくは数塩基長程長くなってもよく、例えば、2塩基のウラシル(U)が付加されていてもよい。また、前記標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント (I) またはコンポーネント (I I I) は、その配列において、いずれかが1から数塩基のU、T、G、CまたはAが少なくとも何 15 れかの末端に有するか、内部において欠失、置換又は付加していてもよい。

次いで、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント (I I) は、ヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列のいずれかであってもよく、またはそれらの組み合わせであってもよい。該ヌクレオチド配列は、例えば、ヌクレオチド配列が1塩基以上10キロ塩基未満のヌクレオチド配列からなる、 20 好ましくは、1塩基長から数百塩基長のヌクレオチド配列、1塩基長から数十塩基長のヌクレオチド配列、1塩基長から20塩基長のヌクレオチド配列、スプライシングなどの細胞に備わる機構により細胞質において上記の長さのヌクレオチドを生じるコンポーネント (I I) 或いは本発明の後記実施例に示される配列番号 3または4に示される配列からなるヌクレオチド配列が例示できる。また該ヌ 25 レオチド配列はコンポーネント (I) または (I I I) の相補的な配列を含んでもよい。また本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列のコンポーネント (I I) の非ヌクレオチド配列としては、ポリアミド骨格を有する核酸類似の化学合成アナログのPNA (peptide nucleic acid) を例示できる。さらにコンポーネント (I I) を構成するヌクレオチド配列としては、ポリA、tRNA、UsnR

- NA、レトロウイルス由来のCTE配列などの細胞質移行性配列、NFカッパβ結合配列、E2F結合配列、SSRE、NF-ATなどのデコイ活性を有する配列、アデノウイルスのVA1、またはVA2 RNAなどのインターフェロン誘導抑制配列、RNase抑制活性、アンチセンス活性、リボザイム活性を有する
- 5 配列、トランスファーRNA或いは発現部位を特定するためのマーカー配列、検出のための大腸菌での選択マーカー配列などのいずれか、またはそれらの組み合わせ配列であってもよい。デコイ活性等の部分的2重鎖を必要とする機能配列は相補的なヌクレオチドを含むことにより作製されてもよい。さらにコンポーネント (I I) の内部にイントロンのドナー配列、アクセプター配列を含むスプライ
- 10 シングに必要な配列を有し、これによりスプライシング機構を有する細胞内において、コンポーネント (I I) の一部が切り出されて再度連結されてもよい。これらコンポーネント (I I) の構成により、より所望のRNA機能抑制効果を増す効果や標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列の物としての安定性が得られる。
- 15 また、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列は、遺伝子組換え技術を用いても製造することもできる。例えば一旦、上記した連続する (I) + (II) + (III) のコンポーネントからなる一本鎖ポリヌクレオチド配列を化学合成した後、該配列の両末端またはその外側に付加可能な任意配列(プロモータ配列、ターミネーター配列を含む)を基に、PCR用プライマーを作製し、PCRにより、該配列
- 20 を2本鎖DNAとした後、増幅することができる。前記において、各コンポーネントを全て化学合成してもよく、あるいは各コンポーネントを化学合成後連結させてもよい。また前記プロモーターは、インビトロ転写や大腸菌においてはT7プロモーター、真核細胞においてはCMVプロモーター、真核細胞P o l I I I I系においてはU6プロモーター、H1プロモーターなどを転写開始点に対して適
- 25 切に配置でき、ターミネーターは、転写終結配列の他、自己切断型リボザイム等により、転写後産物を同部位にて切断することができる。あるいは増幅された2本鎖DNAをその末端に付加可能な制限酵素認識サイトを利用し制限酵素的にベクターに連結し、増幅し、目的とする標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を製造



し、取得することができる。当該分野において各種プラスミドベクターへの組み込みは、技術的に今日何ら困難性はない。

- さらにまた、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列は、遺伝子組換え技術を用いて、コンポーネント (I) および (I I I) が相補性を有することを利用し、作製されてもよい。例えば、コンポーネント (I I) の 3' 末端の数ヌクレオチド (コンポーネント (I) の部分配列) がコンポーネント (I I I) の数ヌクレオチドに相補的になるように、化学的合成法または遺伝子組換え技術を用いてコンポーネント (I) およびコンポーネント (I I I) の相補配列を作製する。数塩基対からなる相補的な 2 重鎖を形成したコンポーネント (I) のヌクレオチド 3' 末端およびコンポーネント (I I I) のヌクレオチド 3' 末端より、DNA ポリメラーゼまたは RNA ポリメラーゼ等を含むヌクレオチド合成酵素を含む酵素を用いて、コンポーネント (I)、(II)、(III) からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドを合成することができ、これにより本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を合成することができる。
- 15    コンポーネント (I I I) はまた、化学的合成法または遺伝子組換え技術を用いて単独に合成され、コンポーネント (I) との相補性を利用してアニーリングさせ、コンポーネント (I) および (I I) からなる分子の 3' 末端とコンポーネント (I, I I) の 5' 末端が化学的に連結またはリガーゼなどの酵素を用いて連結されてもよい。
- 20    さらに、例えば、コンポーネント (I I) の 3' 末端の数ヌクレオチドがコンポーネント (I) または (I I) の数ヌクレオチドに相補的になるように、化学的合成法または遺伝子組換え技術を用いてコンポーネント (I) および (I I) を作製する。このコンポーネント (I) および (I I) からなる分子を細胞内に導入し、細胞内に存在する上記ヌクレオチド合成酵素活性によりコンポーネント
- 25    (I I I) を合成させることができる。ヌクレオチド合成酵素は細胞に遺伝子組換え的にまたはウイルス感染等により導入されたものであってもよい。すなわちコンポーネント (I) および (I I) のみからなる分子も本標的遺伝子用ポリヌクレオチドに含むことができる。

これらのコンポーネント (I) および (I I) からなる標的遺伝子用ポリヌクレオチド、またはコンポーネント (I) および (I I) および (I I I) からなる標的遺伝子用ポリヌクレオチドを発現するベクターは、上記ベクター化の記載に基づき合成することができる。

- 5 さらに、培養細胞等に対して、各分子が異なる標的遺伝子の機能を抑制することができる標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列発現ベクターを導入することができ、これにより所望の表現型変化を引き起こした細胞等を選択することができ、該細胞内に導入されていた標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列発現ベクター
- 10 を単離することができ、標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列発現ベクターのコンポーネント (I) または (I I I) に相補性を有する遺伝子配列をNCBIのblastサーチ等により検索することで、所望の表現型変化を引き起こした標的遺伝子を同定することが可能である。
- この目的を達成するために、上記の相補的合成法、相補的ライゲーション合成法、
- 15 または細胞内相補鎖合成法を用いることにより、いわゆるランダム化標的遺伝子用ポリヌクレオチドを作製することができる。すなわちコンポーネント (I) に相当する各ヌクレオチド部位においてA、T、G、CまたはUのいずれかのヌクレオチドがランダムに導入される合成様式を用いてコンポーネント (I) を合成し、上記方法により相補的なコンポーネント (I I I) が作製される。このこと
- 20 によりランダム化遺伝子標的ベクターを作製することができ、これにより所望の表現型変化を引き起こす標的遺伝子を同定することができる。

かくして、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列がベクターならびに該組換えベクターが挿入された組換えベクターを容易に製造することが可能である。

- 25 上記組換えベクターならびに標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターの製造は、本発明により提供される標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列の配列情報に基づいて、上記したように常法の遺伝子組換え技術〔例えば、Science, 224, 1431 (1984) ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985) ; Proc. Natl. Acad. Sc

i., USA., 80, 5990 (1983)など参照]に従って調製することができる。また、上記で製造された組換え体発現ベクターからの標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列の取得・精製は当業者であれば容易にできる。

- また、標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列を導入した
- 5 ベクターは、2つに分かれたもの場合には、別々のプロモーターから転写させたオリゴRNAが、非常に広い空間である細胞内(オリゴRNAの10の13乗倍の空間)で偶然に出会い、会合し、二重鎖を形成する過程を経る必要があり、この効率が非常に低いため、2つに分かれたタイプは機能が弱いことも推定されるが、本発明標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列のよう
- 10 な標的遺伝子配列に相補的配列を含むコンポーネント (I I I) と、コンポーネント (I I I) の配列に相補的な配列となるコンポーネント (I) の配列が一本鎖となっているために、細胞に導入された配列は相補性を有する分子として、必ずそばに存在することとなり、非常に効率的にRNAを破壊する二重鎖が形成されると考えられ、この点において本発明のベクターの作製の意味は大きい。
- 15 更に一本鎖となることにより、二本鎖に比較し、露出末端の片側を結果として保護することになる(本発明の場合は、コンポーネント (I) の3'末端側)、通常露出末端はヌクレアーゼの攻撃を受けやすいため、この点からも、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列を導入したベクターは、安定性が上昇することとなる。しかしながら2重鎖部分が30塩基対を超える一
- 20 本鎖は脊椎動物では特異的な遺伝子機能抑制を誘導できず、上記の利点以前に有用性が低い。

- 次いで、本発明によれば、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列を用いて、細胞または組織または非ヒト動物または植物における標的遺伝子の機能を抑制する方法を提供することができる。該方法の一具体例
- 25 として、後記実施例で示される通り本発明の配列番号1および2で示される標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を用い、HeLa細胞に対して標的遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子に対して、標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列の投与の結果、該遺伝子RNAのRNA機能抑制効果によって標的遺伝子としたルシフェラーゼ遺伝子のルシフェラーゼ活性抑制効果を示すことができた。

より具体的には、標的とする遺伝子の遺伝子配列情報を基にNCBIのblastサーチ等によって、標的遺伝子のコード領域の開示コドンから50～100塩基下流にあり、50%程度のGまたはCを含んでいるAA(N19)TT配列領域をコンポーネント(I)の一部または全部が相補する領域として選択する。より好ましくは、該領域が標的とする遺伝子特異的配列を有する領域であることがよい。前記のような配列が見つからないケースにおいては、末端部位をAA(N21)もしくはCAとしてコンポーネント(III)領域を相補的となるように設定し、例えば19のオリゴヌクレオチド配列の3'末端に2塩基のウラシルを付加する21のオリゴヌクレオチド配列として塩基決定する、ついでコンポーネント(II)の19のオリゴヌクレオチド配列領域に相補的配列をコンポーネント(I)の構成配列として塩基決定する。ついでコンポーネント(II)として、任意の7または12塩基のRNA配列からなるオリゴヌクレオチド配列を決定し、これらを合わせて、連続する(I)+(II)+(III)のコンポーネントからなる一本鎖ポリヌクレオチド配列を市販の自動合成機にて化学合成し脱塩・精製した後、RNAトランスフェクション用にRNAを蒸留水に溶解し、緩衝液(100mM 酢酸カリウム, pH7.4に調製された30mM HEPES-KOH, 2mM 酢酸マグネシウム)の混合液を調製し、各希釈倍率の溶液をPBSや該緩衝液で希釈する。

次いで、標的遺伝子を有する調製された遺伝子発現ベクターを作製し上記で調製された各RNAを加えて、例えば50 $\mu$ lのOPTI-MEM無血清培地上に標的遺伝子発現ベクターと合成された本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチドを加えた反応溶液を作製し、ここにおいて前記培地に例えばリポフェクタミン2000などのポリカチオン脂質リボソーム系のトランスフェクション試薬を用いると導入効率が上がる。前記試薬を添加した後、例えば株化された動物細胞のHeLa3細胞をコンフルエント状態にした後、DMEM/10培地(DMEM/10:1)0%牛胎児血清を添加したDMEM培地を用いて、5%CO<sub>2</sub>下、37℃で前培養後、細胞をPBSで洗浄後、HeLa3細胞を24穴プレートの各ウェルに0.5mlずつ添加し、5%CO<sub>2</sub>下、37℃で24時間培養し、前記で作製したトランスフェクション用複合体を各ウェルに添加後、さらに5%CO<sub>2</sub>下、37℃で24時間培養した後、例えば標的とする遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子と

する場合は、デュアルルシフェラーゼ・リポター・アッセイ・システム (Dual-Luciferase Reporter Assay System: #E1910 プロメガ社製) を用い、ルシフェラーゼの活性測定の化学発光をルミノメーターなどで測定する。その発光測定値の変化を本発明の標的明遺伝子用オリゴヌクレオチド配列を添加したものと添加しな  
5 かったもの、或いは非特異的オリゴヌクレオチド配列を添加したものをコントロールとして比較した結果から、例えば、コントロールと比較して、その抑制程度が50%、70%、80%、90%、95%、99%、100%などの値を基準として、標的遺伝子のRNAに対する本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列の標的遺伝子に対する特異的なRNA機能抑制ならび  
10 に遺伝子機能抑制効果を検討することができる。かくして、前記したような方法によって、本発明の細胞または組織において、連続する(I)+(II)+(III)のコンポーネントを有する単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を該細胞または該組織に導入し、前記(I)または(III)のコンポーネントのポリヌクレオチド配列と相補する遺伝子のRNAのRNA機能抑制活性を有すること  
15 によって標的遺伝子の機能を抑制する方法を提供することができる。また、本方法の実施において、標的とする遺伝子のRNAを機能抑制する結果、遺伝子の発現が抑制されるか、または該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のタンパク質の発現が抑制されることにより、細胞、組織における該遺伝子の機能に変化が見られることがあり、従って、本発明によれば、細胞または組織において、連  
20 続する(I)+(II)+(III)のコンポーネントを有する単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を該細胞または該組織に導入し、前記(I)または(III)のコンポーネントのポリヌクレオチド配列と相補する遺伝子のRNAのRNA機能抑制活性を有することによって標的遺伝子の機能を抑制する方法によ  
25 って、該標的遺伝子の機能発現を抑制する方法ならびに該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のタンパク質の発現を抑制する方法が提供される。前記方法において、本発明の標的明遺伝子用オリゴヌクレオチド配列は上記したように様々なコンポーネント(II)のヌクレオチド配列の改変・修飾或いは非ヌクレオチドの付加によりRNA機能抑制活性や細胞質移行活性を含めた機能をさらに高めることもできる。

また、上記各試験において使用される細胞、組織、細胞溶解液、臓器などの材料は、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を用いて、標的とする遺伝子RNAのRNA機能抑制活性によって該遺伝子に対するRNA機能抑制効果や遺伝子の機能変化を見るために使用される標的遺伝子の取得は、例えば開示された

5 遺伝子の具体例についての配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる [Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) など参照]。具体的には、標的遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従って cDNA ライブラリーを調製し、該ライブラリーから、

10 本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983) など]。

上記において、cDNAの起源としては、標的遺伝子を発現する各種の細胞、組織、細胞溶解液やこれらに由来する培養細胞などが例示される。また、ヒト体

15 液、血液または組織からのこれらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。また、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれら cDNA ライブラリー、例えばクローンテック社 (Clontech Lab. Inc.) などより市販されている各種 cDNA ライブラリーなどを用いることもできる。或

20 いは寄託または市販されているマウス線維芽細胞 NIH 3 T 3、サルの COS 7 細胞、HeLa 細胞、ヒトの胚性腎細胞の 293 細胞の樹立細胞株を用いてもよい。

上記したように本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターは、その標的とする

25 遺伝子のRNAを機能抑制する活性を有し、該活性により、遺伝子の機能を抑制する遺伝子機能抑制方法を提供することができるため、例えば、遺伝子のRNAの発現を抑制するか、遺伝子によってコードされるアミノ酸のタンパク質の発現を抑制することによって該遺伝子またはタンパク質の機能を抑制することができるので、各種疾患に関連して高発現する遺伝子または遺伝子変異により有害な

機能を有するようになった遺伝子またはウイルス由来遺伝子の発現を抑制することによって、これら遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターは、標的遺伝子用配列または遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、あるいはこれら配列が組み込まれたの

5 組換えベクターを有効成分とする医薬組成物および該医薬組成物からなる遺伝子治療剤を提供することができる。

このように本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターによれば、標的遺伝子の機能を抑制することとなるので、対象とされる各種疾患は、遺伝子の高発現ま

10 たは遺伝子変異により有害な機能を有するようになった遺伝子またはウイルス由来遺伝子との関連が判明している遺伝子関連疾患、例えば、*c-erbB*, *erbB* 遺伝子などに関連している乳がん、*hst-1*, *src*, *fps*, *abl*, *myc*, *jun*, *myb*などの癌関連遺伝子、白血病ウイルス、乳がんウイルス、肉腫ウイルスなどのRNA腫瘍ウイルス、HBV、HCVなどの肝炎ウイルス、

15 NPY遺伝子、ANGPTL3遺伝子が関連した肥満など、遺伝子との関連の有無が判明しているような疾患に対して本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターを有効成分とする医薬組成物は、これら疾患の治療に有効である。

さらに異種間または同種間で行われる臓器または細胞移植において、本発明の

20 遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターを用いることにより、拒絶反応を引き起こす遺伝子の機能を抑制することが可能となり、幹細胞移植を含めた各種臓器疾患、神経疾患の治療に用いることができる。

従って、本発明は、本発明の医薬組成物または医薬組成物を含有する遺伝子治

25 療用ベクターおよび該ベクターにより本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターを導入した細胞を有効成分とする医薬を提供しようとするものである。

即ち、本発明によれば、本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターを含有す

る医薬組成物または遺伝子治療用導入用ベクターおよび該ベクターにより本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターを導入した細胞、並びに該遺伝子治療用導入用ベクターおよび該ベクターにより本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターを導入した細胞を有効成分とする遺伝子治療剤が提供される。

更にまた、本発明によれば、上記本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターを含有する遺伝子治療用導入用のウィルスベクターを有効成分として含有する医薬、  
10 特に、*c-erbB*, *erb* 遺伝子などに関連している乳がん、*hst-1*, *src*, *fps*, *abl*, *myc*, *jun*, *myb* などの癌関連遺伝子、白血病ウィルス、乳がんウィルス、肉腫ウィルスなどのRNA腫瘍ウィルス、これらに対しては抗癌剤として、HBV、HCVなどの肝炎ウィルス、これらに対しては抗肝炎治療剤として、NPY遺伝子、ANGPTL3遺伝子、MGAT遺伝子、D  
15 GAT遺伝子が関連した肥満など、これに対しては抗肥満剤として、疾患関連遺伝子の高発現による活性を抑制するための処置等を使用される当該医薬が提供される。

以下、かかる遺伝子治療につき詳述する。尚、以下の遺伝子治療の実施においては、特記しないかぎり、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝学、  
20 および免疫学の慣用的な方法を用いることができる。これらは、例えばマニアティス(Maniatis, T., et al., Molecular cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982))、サムブルック(Sambrook, J., et al., Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1981))、アウスベル(Ausbel, F.M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, New York, (1992))、グローバー(Glover, D., DNA Cloning, I and II(Oxford Press)(1985))、アナンド(Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press(1992))、グスリー(Guthrie, G., et al., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, (Ac



ademic Press) (1991)) 及びフィンク (Fink, et al., Hum. Gene Ther., 3, 11-19 (1992) に記載されている。

遺伝子治療または遺伝子機能抑制を介する移植治療においては、本発明は、上記したような疾患関連遺伝子の発現する細胞において、細胞内のRNAに対して

5 相補的配列を持つヌクレオチド提供し、該RNAを機能抑制することにより、翻訳またはRNAの機能を阻害し、上記疾患関連遺伝子の発現を抑制するための遺伝子機能抑制医薬の提供による上記のような疾患の病態を惹起するか進行させる活性を抑制または不活性化させる遺伝子治療法を提供する。該治療法は、例えば

10 はこれら配列が組み込まれた組換えベクターを上記疾患関連遺伝子を有する細胞本来のRNA機能抑制させることによって、転写或いは翻訳の過程を阻害し、標的とする遺伝子の発現を抑制する方法である。本方法において、ヌクレオチド相補性の特異性を利用し、異常型のRNAのみの機能を抑制し、正常型の機能を抑制しないアレル特異的機能抑制法を提供することもできる。そのためには遺伝子

15 のRNAと相補的な本発明のコンポーネント (I I I) を含んだ一本鎖ポリヌクレオチドを製造し、該一本鎖ポリヌクレオチドを標的細胞に供給する方法としてとらえることができる。

かかる疾患関連遺伝子の機能発現を抑制する作用を供給すれば、受容細胞／標的細胞における遺伝子機能の活性を抑制することができる。当該遺伝子標的用

20 リヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいはこれら配列が組み込まれた組換えベクターまたはプラスミドを用いて染色体外に維持し、またはレトロウイルスベクターを用いて染色体内に挿入して維持することができ、目的の細胞に導入することができる。

上記遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列、あるいは

25 これら配列が組み込まれた組換えベクターを用いた癌の遺伝子治療によれば、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV由来のベクターに該遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列を組み込み、これを標的遺伝子機能活性発現細胞に感染させて標的とする遺伝子のRNAを機能抑制させることにより、所望の抗癌効果を得ることが出来る。

かかる組換え及び染色体外維持の双方のための所望遺伝子の導入のためのベクターは、当該分野において既に知られており、本発明ではかかる既知のベクターのいずれもが使用できる。例えば、発現制御エレメントに連結した遺伝子標的用のポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列のコピーを含み、かつ目的の細胞内で当該遺伝子標的用のポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列を発現できるウイルスベクターまたはプラスミドベクターを挙げることができる。かかるベクターとして、通常前述する発現用ベクターを利用することもできるが、好適には、例えば起源ベクターとして、米国特許第5252479号明細書およびPCT国際公開WO93/07282号明細書に開示されたベクター（pWP-7A、pWP-19、pWU-1、pWP-8A、pWP-21および/またはpRSVLなど）またはpRC/CMV（Invitrogen社製）などを用いて、調製されたベクターを挙げることができる。より好ましくは、後述する各種ウイルス・ベクターである。

なお、遺伝子導入治療において用いられるベクターに使用されるプロモーターとしては、各種疾患の治療対象となる患部組織に固有のものを好適に利用することができる。

その具体例としては、例えば、肝臓に対しては、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、トランスフェリン、トランススチレンなどを例示できる。結腸に対しては、カルボン酸アンヒドラーゼI、カルシノエンプロゲンの抗原などを例示できる。子宮および胎盤に対しては、エストロゲン、アロマターゼサイトクロームP450、コレステロール側鎖切断P450、17アルファヒドロキシラーゼP450などを例示できる。

前立腺に対しては、前立腺抗原、gp91-フォックス遺伝子、前立腺特異的カリクレインなどを例示できる。乳房に対しては、erb-B2、erb-B3、 $\beta$ -カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロビン、乳漿蛋白質などを例示できる。肺に対しては、活性剤蛋白質Cウログロブリンなどを例示できる。皮膚に対しては、K-14-ケラチン、ヒトケラチン1又は6、ロイクリンなどを例示できる。

脳に対しては、神経膠繊維質酸性蛋白質、成熟アストロサイト特異蛋白質、ミエリン、チロシンヒドロキシラーゼ、膵臓ヴィリン、グルカゴン、ランゲルハンス

島アミロイドポリペプチドなどを例示できる。甲状腺に対しては、チログロブリン、カルシトニンなどを例示できる。骨に対しては、 $\alpha 1$ コラーゲン、オステオカルシン、骨シアログリコプロテインなどを例示できる。腎臓に対してはレニン、肝臓／骨／腎臓アルカリ性ホスファターゼ、エリスロポエチンなどを、脾臓に対しては、アミラーゼ、PAP1などを例示できる。

さらになお、遺伝子導入治療において用いられるベクターに使用されるプロモーターとしては、タンパク質をコードしない短いRNAを発現することが知られているU6 snRNA、7SK、tRNAなどのPol III系プロモーターを使用することができる。またpol III系の人工的に改変されたプロモーターが使用できる。

なお遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列導入用ベクターの製造において、導入される遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列は、標的遺伝子の塩基配列情報に基づいて、前記の如く、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる。

かかる遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列導入用ベクターの細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈法、ウイルス形質導入、HVJエンベロープ法などを始めとする、細胞にRNAまたはDNAを導入する当該分野において既に知られている各種の方法に従って行うことができる。なお、遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列で形質転換された細胞は、それ自体単離状態で遺伝子により発現される機能の活性を抑制するための医薬や、治療研究のためのモデル系として利用することも可能である。

遺伝子治療においては、上記の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列導入用ベクターは、患者の対象とする組織部位に局所的にまたは全身的に注射投与することにより患者の標的細胞内に導入することができる。この際全身的投与によれば、他の部位に癌遺伝子や腫瘍ウイルスの標的遺伝子RNAが発現し得るいずれの細胞にも到達させることができる。形質導入された遺伝子が各標的細胞の染色体内に恒久的に取り込まれない場合には、該投与を定期的

に繰り返すことによって達成できる。レトロウイルス等を用いて恒久的に導入することもできる。

本発明の遺伝子治療方法は、前述する遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列導入用の材料（遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列導入用ベクター）を直接体内に投与するインビボ（in vivo）法と、患者の体内より一旦標的とする細胞または組織を取り出して体外で遺伝子を導入して、その後、該細胞または組織を体内に戻すエキスビボ（ex vivo）法の両方の方法を包含する。

また遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列または該配列をPCR法で増幅した配列を直接細胞内に導入し、RNA鎖を切断することも可能である。

また、遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列を導入する標的細胞は、遺伝子治療（処置）の対象により適宜選択することができる。例えば、標的細胞として、癌遺伝子の発現が認められる癌細胞、特に乳房、腎臓、精巣、小腸組織以外に、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞、脂肪細胞、如き細胞などを挙げることもできる。

上記遺伝子治療における遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列導入方法には、ウイルス的導入方法及び非ウイルス的導入方法が含まれる。

ウイルス的導入方法としては、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる方法を挙げることができる。その他のウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、HIV（human immunodeficiency virus）ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター（AAV, adeno-associated virus）、ヘルペスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクター及びエプスタインバーウイルス（EBV, Epstein-Barr virus）ベクターなどがあげられる。

非ウイルス的な遺伝子導入方法としては、リン酸カルシウム共沈法；ポリヌクレオチドを封入したリポソームと予め紫外線で遺伝子を破壊した不活性化センダイウイルスを融合させて膜融合リポソームを作成し、細胞膜と直接融合させポリヌクレオチドを細胞内に導入する膜融合リポソーム法；ポリヌクレオチドのプラ

スミドを金でコートして高圧放電によって物理的に細胞内にポリヌクレオチドを導入する方法；オリゴヌクレオチドのプラスミドを直接インビボで臓器や腫瘍に注入するネイキッド (naked) ポリヌクレオチド法；多重膜正電荷リボソームに包埋した遺伝子を細胞に導入するカチオニック・リボソーム法；特定細胞のみに

5 遺伝子を導入し、他の細胞に入らないようにするために、目的とする細胞に発現するレセプターに結合するリガンドを本発明のポリヌクレオチドと結合させてそれを投与するリガンド-DNA複合体法などを使用することができる。

一例として、本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列導入用EBVベクターの製造につき概略すると、EBウイルス (Epstein-Barr virus: EBV) は、1964年にエプスタイン (Epstein) らによりパーキット (Burkitt) リンパ腫由来の培養細胞より分離されたヘルペス科に属するウイルスである [Kieff, E. and Liebowitz, D.: Virology, 2nd ed. Raven Press, New York, 1990, pp. 1889-1920]。該EBVには細胞をトランスフォームする活性があるので、遺伝子導入用ベクターとするためには、このトランスフォーム活性を

15 欠いたウイルスを調製しなければならない。これは次の如くして実施できる。

即ち、まず、所望の外来遺伝子を組み込む標的DNA近傍のEBVゲノムをクローニングする。そこに外来遺伝子に相補的配列を有するポリヌクレオチド断片と薬剤耐性遺伝子を組み込み、組換えウイルス作製用ベクターとする。次いで適当な制限酵素により切り出された組換えウイルス作製用ベクターをEBV陽性Akata細胞にトランスフェクトする。相同組換えにより生じた組換えウイルスは抗表面免疫グロブリン処理によるウイルス産生刺激により野生型Akata EBVとともに回収できる。これをEBV陰性Akata細胞に感染し、薬剤存在下で耐性株を選択することにより、野生型EBVが共存しない所望の組換えウイルスのみが感染したAkata細胞を得ることができる。さらに組換えウイルス感

20 染Akata細胞にウイルス活性を誘導することにより、目的とする大量の組換えウイルスベクターを産生することができる。

組換えウイルスベクターを用いることなく所望の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列を標的細胞に導入する、非ウイルスベクターの製造は、例えば膜融合リボソームによる遺伝子導入法により実施することができ

る。これは膜リポソーム（脂質二重膜からなる小胞）に細胞膜への融合活性をもたせることにより、リポソームの内容物を直接細胞内に導入する方法である。

上記膜融合リポソームによるアンチセンス・オリゴヌクレオチドの導入は、例えば中西らの方法によって行うことができる [Nakanishi, M., et al., Exp. Cell Res., 159, 399-499 (1985); Nakanishi, M., et al., Gene introduction into animal tissues. In Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery (ed. by Lee, V.H. et al.), Harwood Academic Publishers GmbH, Amsterdam, 1995, pp. 337-349]。

また、別のリポソームを用いて遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列を標的細胞に導入する方法としては、カチオニック・リポソームによるアンチセンス・ポリヌクレオチド導入法を挙げることができる。該方法は、八木らの方法に準じて実施できる [Yagi, K., et al., B. B. R. C., 196, 1042-1048 (1993)]。この方法は、プラスミドも細胞も負に荷電していることに着目して、リポソーム膜の内外両面に正の電荷を与え、静電気によりプラスミドの取り込みを増加させ、細胞との相互作用を高めようとするものである。ここで用いられるリポソームは正荷電を有する多重膜の大きなリポソーム (multilamellar large vesicles: MLV) が有用であるが、大きな1枚膜リポソーム (large unilamellar vesicles: LUV) や小さな1枚膜リポソーム (small unilamellar vesicles: SUV) を使用してプラスミドとの複合体を作製し、所望の遺伝子標的

用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列を導入することも可能である。

本発明の遺伝子治療において、所望遺伝子の標的細胞または標的組織への導入方法には、代表的には2種類の方法が含まれる。

その第1法は、治療対象とする患者から標的細胞を採取した後、該細胞を体外で例えばインターロイキン-2 (IL-2) などの添加の下で培養し、レトロウイルスベクターに含まれる目的とする遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列を導入した後、得られる細胞を再移植する手法 (ex vivo 法) である。該方法はADA欠損症を始め、欠陥遺伝子によって発生する遺伝子病や動脈硬化症、癌、AIDSなどの治療に好適である。

第2法は、目的遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）を直接患者の体内や脳、腎臓、精巣、小腸組織などの標的部位に注入する遺伝子直接導入法（直接法）である。

- 5 上記遺伝子治療の第1法は、より詳しくは、例えば次のようにして実施される。即ち、患者から採取した単核細胞を血液分離装置を用いて単球から分取し、分取細胞をIL-2の存在下にAIM-V培地などの適当な培地で72時間程度培養し、導入すべき遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）を含有するベクターを加える。遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列の導入効率をあげるために、プロタミン存在下に32℃で1時間、2500回転にて遠心分離した後、37℃で10%炭酸ガス条件下で24時間培養してもよい。この操作を数回繰り返した後、更にIL-2存在下にAIM-V培地などで48時間培養し、細胞を生理食塩水で洗浄し、生細胞数を算定し、
- 10 遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列の導入効率を前記 *in situ* PCRや、例えば所望の対象が疾患関連遺伝子の発現する機能活性であればその活性の程度を測定することにより、目的遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）の導入効果を確認する。
- 20 また、培養細胞中の細菌・真菌培養、マイコプラズマの感染の有無、エンドトキシンの検索などの安全度のチェックを行い、安全性を確認した後、予測される効果用量の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）が導入された培養細胞を患者に点滴静注により戻す。かかる方法を例えば数週間から
- 25 数カ月間隔で繰り返すことにより遺伝子治療が施される。

ここでウイルスベクターの投与量は、導入する標的細胞により適宜選択される。通常、ウイルス価として、例えば標的細胞  $1 \times 10^8$  細胞に対して  $1 \times 10^3$  c f u から  $1 \times 10^8$  c f u の範囲となる投与量を採用することが好ましい。

上記第1法の別法として、目的遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）を含有するレトロウイルスベクターを含有するウイルス産生細胞と例えば患者の細胞とを共培養して、目的とする細胞へ遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）を導入する方法を採用することもできる。

遺伝子治療の第2法（直接法）の実施に当たっては、特に体外における予備実験によって、遺伝子導入法によって、実際に目的遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）が導入されるか否かを、予め遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列のPCR法による検索やin situ PCR法によって確認するか、あるいは目的遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）の導入に基づく所望の治療効果である特異的活性の上昇や標的細胞の増殖増加や増殖抑制などを確認することが望ましい。また、ウイルスベクターを用いる場合は、増殖性レトロウイルスなどの検索をPCR法で行うか、逆転写酵素活性を測定するか、あるいは膜蛋白(env)遺伝子をPCR法でモニターするなどにより、遺伝子治療に際して遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列の導入による安全性を確認することが重要であることはいふまでもない。

本発明はまた、本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列あるいはこれらの配列を組み込んだ導入用ベクターまたは目的遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列（疾患関連遺伝子のRNAに相補的オリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド）が導入された細胞を活性成分とし、それを薬学的有効量、適当な無毒性医薬担体ないしは希釈剤と共に含有する医薬組成物または医薬製剤（遺伝子治療剤）を提供する。

本発明の医薬組成物（医薬製剤）に利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面



活性剤、滑沢剤などの希釈剤ないし賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用できる。

例えば、本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列導入用ベクターを含む医薬製剤は、該ベクターをリポソームに包埋された形態  
5 あるいは所望の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列が包含されるレトロウイルスベクターを含むウイルスによって感染された培養細胞の形態に調製される。

これらは、リン酸緩衝生理食塩液（pH 7.4）、リンゲル液、細胞内組成液  
10 用注射剤中に配合した形態などに調製することもでき、またプロタミンなどの遺伝子導入効率を高める物質と共に投与されるような形態に調製することもできる。

上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。

上記医薬製剤中に含有されるべき有効成分の量及びその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件など  
15 に応じて広範囲より適宜選択される。

一般には、医薬製剤としての所望遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列含有レトロウイルスベクターの投与量は、1日当たり体重1kg  
20 当たり、例えばレトロウイルスの力価として約 $1 \times 10^3$  p f u から $1 \times 10^{15}$  p f u 程度とするのがよい。

また所望の導入用遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列が導入された細胞の場合は、 $1 \times 10^4$  細胞/body から $1 \times 10^{15}$  細胞/body 程度の範囲から選ばれるのが適当である。

該製剤は1日に1回または数回に分けて投与することもでき、1から数週間間隔で間欠的に投与することもできる。尚、好ましくは、プロタミンなど遺伝子導  
25 入効率を高める物質またはこれを含む製剤と併用投与することができる。

また、本発明の細胞または組織において、連続する(I)+(I I)+(I I I)のコンポーネントを有する単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を該細胞または該組織に導入し、前記(I)または(I I I)のコンポーネントのポリヌクレオチド配列と相補する遺伝子のRNAのRNA機能抑制活性を有することに

よって標的遺伝子の機能を抑制する方法ならびに該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のタンパク質またはRNAの発現を抑制する方法が提供により、また標的遺伝子の機能の変化を容易に試験する方法が提供される。該方法は、例えば後期実施例に示されるように、本発明の標的標的遺伝子のmRNAのRNA機能抑制活性を有することによって標的遺伝子の機能を抑制する方法により、対応して現れる遺伝子の機能の変化を合わせて観察することができる。該遺伝子の機能変化は、遺伝子の発現の抑制を判定するノーザンブロット分析、DNAアレイ分析や遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のタンパク質の発現の抑制を判定する、タンパク質に対する抗体を用いるイムノブロット分析などとともに、酵素反応、蛍光反応など各種活性機能の変化を同時に検出し、かくし本発明の方法によれば該細胞または組織において検出される全ての遺伝子またはタンパク質の発現量の変動等を含む細胞、組織の有する機能の変化も観察することができる方法を提供することができる。

さらに本発明によれば、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を用いる上記各方法によって産生した培養された細胞または組織の機能が低下したノックダウン細胞または組織または非ヒト動物または植物を提供することができ、本発明は、本発明の遺伝子破壊する方法によって産生した培養された細胞または組織または非ヒト動物または植物の機能が低下したノックダウン細胞、組織、非ヒト動物または植物を提供することができる。非ヒトノックダウン動物の作製においては、本発明の遺伝子標的用ポリヌクレオチド配列、または標的遺伝子用配列あるいはこれらの配列を組み込んだ導入用ベクターを受精卵に導入することなどにより容易に達成され、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、カエル、サカナなどのノックダウン動物を作成することができる。植物においても同様に、ダイズ、インゲンマメ等の豆科植物、イネ、小麦、とうもろこし、イモ類等の穀物類、キュウリ、トマト、ピーマン、ナス、アスパラガス、タマネギ等の野菜類、リンゴ、ブドウ、イチジク、キウイ、柑橘類（ミカン等）、ストロベリー、アーモンド、モモ、メロン、クルミなどの果物または木の実植物、ヒノキ、ヤシ、スギ、カエデ、シダ類、クチナシ、ニチニチソウ等の装飾作物、バラ、カーネーション、菊、ヒルガオ、ハウセンカ、ベ

ゴニア等の観賞用植物などについて、容易にノックダウン植物を作成することができる

該機能が低下したノックダウン細胞または組織または該非ヒト動物または該植物の提供によれば、該細胞または組織を用いて、該細胞または組織の機能に影響  
5 を与えることができるかもしれない候補化合物を検出することができる。前記において、細胞または組織または非ヒト動物または植物の機能の変化に併せて病気の病態や生物の発育、耐性などに変化が観られることがむすびつけられるならば、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列を用いて、前記細胞、組織などへの候補化合物を投与し、遺伝子の機能の変化を観察するこ  
10 とにより、細胞、組織などへの影響を観ることができ、候補化合物の医薬、農業などの領域への有用性を判定することができる。

上記のように本発明はまた、被検化合物を細胞または組織と共に培養した後、該細胞または組織に対して、連続する(I)+(II)+(III)のコンポーネントを有する単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列該細胞または該組織  
15 に導入し、前記前記(I)または(III)のポリヌクレオチド配列と相補する遺伝子のRNAのRNA機能抑制する活性を、コントロールと比較して標的遺伝子のRNAの破壊を促進する候補化合物を検出する方法を提供することができる。

また、上記候補化合物を検出する方法としては、例えば本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を用いて、医薬品標的遺伝子をスクリーニングする方法に  
20 において、

細胞または組織において、連続する(I)+(II)+(III)のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を該細胞または該組織または該非ヒト動物に導入し、前記(I)または(III)のコンポーネントのポリヌクレオチド配列と相補する遺伝子のmRNAのRNA機能抑制する活性をす  
25 ることによって標的遺伝子の機能を刺激または抑制する化合物を同定するためのスクリーニング法として、より詳しくは、以下の方法：

(a) 候補化合物と、該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物（または該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物を担持している細胞もしくは

はその膜) またはその融合タンパク質との結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合させた標識により測定する方法、

(b) 候補化合物と、該一本鎖ポリヌクレオチド配列が導入された細胞 (または該一本鎖ポリヌクレオチド配列を担持している細胞もしくはその膜) またはその

5 融合物との結合を、標識競合物質の存在下で測定する方法、

(c) 候補化合物が該一本鎖ポリヌクレオチド配列により、標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは該標的遺伝子発現産物の活性化または抑制により生ずるシグナルをもたらすか否かを、前記ポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物を担持している細胞または細胞膜に適した検出系を用いて調

10 べる方法、

(d) 候補化合物と、標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物を含有する溶液とを同時に混合して混合物を調製し、該混合物中の該ポリペプチドまたは該標的遺伝子発現産物の活性を測定し、該混合物の活性をスタンダードと比較する方法、および

15 (e) 候補化合物が細胞における該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドをコードする mRNA および該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドの産生に及ぼす効果を検出する方法よりなる群から選択される方法のいずれかを用いることを特徴とする医薬品標的遺伝子をスクリーニングする方法を用いることが可能である。

20 上記において、候補化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列を用いて、

25 前記細胞、組織または非ヒト動物などへの候補化合物を投与し、遺伝子の機能の変化を観察することにより、コントロールと比較して標的遺伝子の RNA の破壊を促進する候補化合物を検出する方法の具体的方法の一例としては、後記実施例に示された標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列をトランスフェクションする前後において候補化合物を添加した細胞または組織溶解液など共に培養し、前後にお

ける本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列による標的遺伝子の破壊を促進または抑制する程度を観察することで、候補化合物の効果(測定活性に与える影響)を判定することができる。

候補化合物の効果は、例えば、上記活性試験の場合において候補化合物の測定  
5 活性に与える影響がコントロールまたは候補化合物非添加と比較して、約20%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上促進している場合、該候補化合物を本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列の作用を促進する化合物として選択することができる。一方、例えば、上記活性試験の場合における候補化合物の測定活性に与える影響がコントロールまたは候補化合物非添加と比較  
10 して、約20%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上阻害されている場合、該候補化合物を本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列の作用を阻害する化合物として選択することができる。

また、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる候補化合物を医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発  
15 明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクター等を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとして行うことができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラ  
20 ット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、癌治療の目的で本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターの  
25 癌細胞にある標的遺伝子のRNAのRNA機能抑制活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、癌治療の目的で本

発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターの癌細胞にある標的遺伝子のRNAのRNA機能抑制活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約50.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も同様である。

- また、本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列、または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターを用いることにより、標的遺伝子破壊動物を提供することができる。すなわち、本発明は、標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列、または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターを有する非ヒト哺乳動物、非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である動物、前記ゲッ歯動物がマウスまたはラットである前記動物を提供するものである。
- 15 本発明は、標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列、または標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターを有する非ヒト哺乳動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とする標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列、また標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターを転移することによって作出することができる。また、該標的
- 20 遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列、また標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターの転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列、また標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクターを転移し、細胞培養、組

織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列、標的遺伝子用配列、また標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列または標的遺伝子用配列が挿入された組換えベクター転移動物を作出することもできる。

- 5 該非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病態動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1
- 10 系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。また同様に、ヒトへの臓器移植時に、臓器拒絶反応に関わる遺伝子等を抑制したノックダウンブタなどが好ましい。

- 本発明によれば標的遺伝子のRNA機能抑制活性を有する一本鎖ポリヌクレオチド、該一本鎖ポリヌクレオチドによってその標的遺伝子の機能発現を抑制制御
- 15 する方法を提供することができ、そして該遺伝子機能発現を選択的に抑制することによって、目的とするタンパク質またはRNAの機能発現を抑制制御することが可能な一本鎖ポリヌクレオチドならびにその機能発現を抑制方法を提供することができる。また本発明によれば、簡便な遺伝子の機能解析方法、医薬品標的遺
- 20 伝子のスクリーニング方法、ノックダウンマウス作製による医薬品標的遺伝子のインビボ評価方法、遺伝子疾患に対する医薬組成物（遺伝子治療剤）を提供することが可能となる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

#### 25 実施例1：本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチドの合成

本実施例においては、標的遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子(Genbank Accession No. U47296)の配列位置434-452に相当する19ヌクレオチドの配列をRNAインターフェアランスの標的部位として、2種のコンポーネント配列を有する標的遺伝子用ポリヌクレオチドを合成した。

RNA配列の合成は、ホスホロアミダイト法を用いる市販の自動合成機 (Applied Biosystems 社製ABI 3900ハイスループットDNA合成器) とともにRNA合成用試薬を用いて合成した。尚、非特異的コントロール用として、EGFP (Genbank Accession No. U55763)の配列位置936-954に相補する21merからなるフォワード配列(F)とリバース配列(R)のRNAを合成した。

かくして得られた本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチドのうち、コンポーネント(II)の配列が12塩基のものをuGL3.12RNAと命名し、コンポーネント(III)の配列が7塩基のものをuGL3.7RNAと命名した。合成されたuGL3.12RNAおよびuGL3.7RNAの配列はそれぞれ配列番号1および2に示され、uGL3.12RNAおよびuGL3.7RNAのコンポーネント配列は配列番号3および4に示される。

また、非特異的コントロール用として、EGFPの配列位置936-954に相補する21merからなるフォワード配列(F)RNAとリバース配列(R)RNAの配列番号5および6に示されるとおりであり、上記配列の末端にそれぞれ2塩基のUU(ウラシル)が付加されたものである。

実施例2：本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチドを用いたRNA機能抑制活性試験

#### 1. RNAトランスフェクション用RNAの調製

上記で得られたuGL3.12RNA (142ナノモル) およびuGL3.7RNA (135 ナノモル) を各々蒸留水に溶解して100ピコモル/ $\mu$ l液を調製した。

次いで30 $\mu$ lの上記RNA溶解液、30 $\mu$ lの蒸留水、および240 $\mu$ lの緩衝液(100mM 酢酸カリウム, pH7.4に調製された30mM HEPES-KOH, 2mM 酢酸マグネシウム)の混合液を調製し、uGL3.12RNA原液およびuGL3.7RNA原液(原液:10pmole/ $\mu$ l)とした。希釈倍率(X5、X50)に応じた希釈は全て上記緩衝液で行った。

#### 2. 非特異的コントロールsiRNAの調製

上記実施例1で得られたEGFP遺伝子の配列位置936-954に相補する21merからなる1本鎖フォワード配列(F)RNAとリバース配列(R)RNAの



各10ピコモルずつを混合し、アニーリングバッファを加えて100 $\mu$ lとし、緩衝液によって5倍希釈して、コントロールsiRNA溶液(EGFPc2)とした。

### 3. トランスフェクション複合体の調製

レポーター遺伝子発現ベクターの調製は、ルシフェラーゼのレポーター遺伝子5を有するクローニングベクターpGL3-コントロール(pGL3-control:プロメガ社製)および(ウミシイタケ:Renilla)ルシフェラーゼ遺伝子を有するpRL/TK(pRL/TK:プロメガ社製)のそれぞれに、上記で調製された各RNAを加えてトランスフェクション複合体の調製を行なった。

即ち、50 $\mu$ lのOPTI-MEM無血清培地(ギブコ-BRL社製)に上記各レポーター遺伝子(1 $\mu$ gのpGL3-Controlと0.1 $\mu$ gのpRL/TK)、および本発明の標的遺伝子用ポリヌクレオチドのuGL3.12RNAおよびuGL3.7RNA、または非特異的コントロールsiRNAを加えた溶液(EGFPc2)を調製した(a液)。

別途50 $\mu$ lのOPTI-MEM培地に1.5 $\mu$ lのリポフェクタミン2000(LipofectAmine2000:ライフ・テクノロジー社製)を加えて懸濁し、室温で5分間清置した(b液)。そしてa液とb液を混合して、20分間反応し、トランスフェクション複合体とした。

### 4. トランスフェクション

まず、HeLa3細胞をコンフルエント直前までDMEM/10培地(DMEM/10:10%牛胎児血清(INTERGEN社製、#1020-90)を添加したDMEM培地(Si IGMA社)を用いて、10センチ径のシャーレにて、5%CO<sub>2</sub>下、37℃で前培養した。前培養後の細胞をPBSで洗浄後、1mlのトリプシン-EDTAで処理して細胞を剥がし、10mlのDMEM/10に再懸濁した。血球計算盤を用いて細胞数を計測し、1.2 $\times 10^5$ /0.5mlとなるよう、DMEM/10を用いて調製した。HeLa3細胞を24穴プレートの各ウェルに0.5mlずつ添加し、5%CO<sub>2</sub>下、37℃で24時間培養した。

トランスフェクションは、24穴プレートのHeLa3細胞の培養上清を吸引除去し、新しいDMEM/10を0.5mlずつ各ウェルに添加した。次いで0.

1 ml のトランスフェクション複合体を各ウェルに添加後、プレートをややかに揺すって均一にした後、5%CO<sub>2</sub>下、37℃で24時間培養した。

#### 5. ルシフェラーゼの活性測定

デュアルルシフェラーゼ・リポーター・アッセイ・システム (Dual-Luciferase Reporter Assay System: #E1910 プロメガ社製) を用い、操作はこの試薬に添付のプロトコールに沿った。培養プレートにキットに添付の溶解緩衝液 400 μl を加え、細胞を溶解させた後、卓上遠心機で 1500 rpm、5 秒遠心し、この上清 20 μl を、添付の反応試薬 LARII 100 μl に混合し、1 回目の化学発光をルミノメーターで測定は、GENios (TECAN 社) の発光測定プログラムを用いて行った。

ホタル・ルシフェラーゼの測定値を、(ウミシイタケ: Renilla) ルシフェラーゼ (インターナルスタンダード) の値で補正し、更に RNA 非存在下での数値を 1.0 として、F-Luc/R-Luc の相対値を算出した。

結果を図 1 または表 1 に示す。

15 表 1

	PP-Luc	Rr-Luc	Pp/Rr	補正值
コンボ (II) 7 塩基原液	3004	70136	0.04	0.09
コンボ (II) 7 塩基原液 x5 倍希釈	25376	223084	0.11	0.24
コンボ (II) 7 塩基原液 x50 倍希釈	100749	320428	0.31	0.65
溶媒	149861	310559	0.48	1.00
コンボ (II) 12 塩基原液	3726	72009	0.05	0.11
コンボ (II) 12 塩基原液 x5 倍希釈	31507	304565	0.10	0.21
コンボ (II) 12 塩基原液 x50 倍希釈	108888	309057	0.35	0.73
EGFP2 x5 倍希釈	112486	233487	0.48	1.00

図 1 または表 1 に示されたように、試験結果を補正值でみると、非特異的配列によるコントロールを 1.00 として比較すると、コンポーネント (II) が 7 塩基長においては、50 倍希釈、5 倍希釈、原液が、それぞれ 0.65、0.24、0.09 と濃度依存に数値が小さくなり、原液においては約 90% 活性が抑制され、同様に 12 塩基長においては、50 倍希釈、5 倍希釈、原液が、それぞれ 0.73、0.21、0.11 と濃度依存に数値が小さくなり、原液においては約 90% 活性が抑制され、コンポーネント (II) の大きさにかかわらず、

いずれにおいても、濃度依存的にルシフェラーゼ活性を抑制していることが判明した。

図1または表1の結果から、本発明の一本鎖の標的遺伝子用ポリヌクレオチドの u G L 3 . 1 2 R N A および u G L 3 . 7 R N A によって標的遺伝子であるルシフェラーゼ活性が濃度依存的に抑制され、RNA機能抑制活性を有することが確認された。

また、本試験においてはコンポーネント(I I)の長さ(7塩基長または12塩基長)による活性の差異は認められなかった。

続いてコンポーネント(I I)がヘアピンのような相補的な配列(−A A T T  
10 −)であっても、RNA機能抑制活性を有することが確認された(データ示さず)。

### 実施例3 Lamin A/C 遺伝子機能抑制ベクターによる RNA 機能抑制効果

本実施例においては標的遺伝子を Lamin A/C 遺伝子(Genbank Accession No. X03445)の配列位置 640-662 に相当する 23 ヌクレオチドの配列を RNA インターフェアランスの標的部位として細胞内で発現するベクターを作製し、その RNA 機能抑制効果を評価した。

#### (1) Lamin A/C 遺伝子機能抑制細胞の作製

##### 1. Lamin A/C 遺伝子機能抑制ベクターの作製:

20 Lamin A/C 遺伝子機能抑制ベクターは以下のように調製した。

ヒト U6 promoter を以下のプライマーを用いて(オリゴマー1および2; 配列番号 7, 8) PCR により増幅した。この PCR 増幅断片を鋳型にして、オリゴマー1(配列番号 7)およびオリゴマー3(配列番号 9)を用いて PCR を行い、制限酵素 *Csp45I* 切断部位を導入した改変 U6 promoter を作製した。この増幅断片を制限  
25 酵素 *EcoRI* および *XbaI* で切断し、同様に制限酵素 *EcoRI* および *XbaI* で切断した pUC19 ベクターへクローニングした(pUC19U6)。

マウス H1 promoter は以下のプライマーを用いて(オリゴマー4および5; 配列番号 10, 11) PCR で増幅した後に、増幅断片を制限酵素 *EcoRI* および *SaII* で切

断した。この DNA 断片を *EcoRI* および *SaII* で切断した pUC19 ベクターへクローニングした (pUC19 H1)。

オリゴマー名 1 (配列番号 7) : U6P.F, 枠内 ; *EcoRI* 切断部位

5 TCTTTGGAATTCAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA

オリゴマー名 2 (配列番号 8) : U6CSP45R, 枠内 ; *Csp45I* 切断部位

TGCTGCCGAAGCGAGCACGGTGTTCGAACCTTCCACAAG

10 オリゴマー名 3 (配列番号 9) : U6P.R, 枠内 ; *XbaI* 切断部位

AAAAATCTAGATGTAAAAATAGTGTGTGTGCCTAGGATATGTGCTGCCGAAGCGAGCAC

オリゴマー名 4 (配列番号 10) : mH1.F, 枠内 ; *EcoRI* 切断部位

TTTTTGAATTCATGCAAATTACGCGCTGTG

15

オリゴマー名 5 (配列番号 11) : mH1.R, 枠内 ; *SaII* 切断部位)

CCAAGGTCGACAAAAAGATATCTGGATCCGTCTAGACCGGCCGCGCCACTATAAG

次にオリゴマー 1 (配列番号 12) とオリゴマー 2 (配列番号 13) をアニーリングさせ、Ex-Taq (宝酒造) で DNA 合成した後に *XbaI*、*SaII* で切断して、同様に *XbaI*、*SaII* で切断した pUC19H1 ベクターへとクローニングし、pUC19H1-Lamin と命名した。

また pUC19 vector の制限酵素 *NdeI* サイトに以下のプライマー (オリゴマー 5 および 6、配列番号 16, 17) で pcDNA3.1(+) ベクター (invitrogen 社) から増幅した  
25 ネオマイシン耐性遺伝子を挿入して、pUC19-neo ベクターを作製した。このベクターの *EcoRI*、*HindIII* 切断部位に、pUC19H1-Lamin ベクターから *EcoRI*、*HindIII* によって切断した、RNA 抑制機能を有する断片を導入し、Lamin A/C 遺伝子機能抑制ベクターとした。

オリゴマー名 1 (配列番号 12) : hLaminAC-4.H1F, 枠内 ; *Xba*I 切断部位、下線 ; stem 領域、斜体 ; loop 領域

AAAGGTCTAGCCCTAAAGAATAAGTCTTCTCCAGCTCCTTAAAGAG

5 オリゴマー名 2 (配列番号 13) : hLaminAC-4.R, 枠内 ; *Sa*II 切断部位、下線 ; stem 領域、斜体 ; loop 領域

ATTATGTCGACAAAAAGAATAAGTCTTCTCCAGCTCCTTAAAGAG

オリゴマー名 3 (配列番号 14) : Neo-Nde.F, 枠内 ; *Nde*I 切断部位

10 AGAATTCCATATGTGGAATGTGTGTCAGTTAG

オリゴマー名 4 (配列番号 15) : Neo-Nde.R, 枠内 ; *Nde*I 切断部位

AGAATTCCATATGAGGTCGACGGTATACAGAC

- 15 2. トランスフェクション複合体の調製 : 上記 1 で得られた Lamin A/C 遺伝子機能抑制ベクターの 1  $\mu$ g を 50  $\mu$ l の OPTI-MEM (invitrogen 社製) に加えた (A 液)。別に、3  $\mu$ l の リポフェクタミン 2000 (Invitrogen 社製) を 50  $\mu$ l の OPTI-MEM に加えて混合し、5 分間室温で静置した (B 液)。A 液と B 液を混合し、20 分間室温で反応して、トランスフェクション複合体を調製した。
- 20 3. トランスフェクション : トランスフェクション前日に、10% の FBS を添加した DMEM 培地 (シグマ社製) を用いて、HeLa S3 細胞の  $2 \times 10^5$ /ml 溶液を調製し、24 穴プレートの一ウエル当たり 0.5ml ずつ加えた。CO<sub>2</sub> 培養器 (サンヨー社製) にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で一晩前培養を行った。上記 2 で調製したトランスフェクションミックスを、24 穴プレートの一ウエル当たり 100  $\mu$ l 加えた後、培養プレートを CO<sub>2</sub> 培養器に戻し、引き続き一晩培養を行った。
- 25 4. 細胞の選別と株化 : 細胞培養プレート of 各ウエルを PBS にて洗浄後、トリプシン EDTA 溶液 (Invitrogen 社製) で細胞を剥がして回収した。回収後の細胞を、10ml の 10%FBS を加えた DMEM 培地 (シグマ社製) に再懸濁し、10cm ディッシュに全量をまいた。翌日、培養上清を吸引除去し、10ml の選択培養

液 (10%FBS、500  $\mu$ g/ml のジェネティシン (Invitrogen 社製) を含む DMEM 培地 (シグマ社製) ) を加えた。2 から 3 日に一度、新しい選択培養液に交換しながら CO<sub>2</sub> 培養器 (サンヨー社製) にて 37℃、5%CO<sub>2</sub> で培養を行い、最終的に 31 個のジェネシテイン耐性の細胞株を得た。得られた株を Lamin A/C 遺伝子機能抑制細胞株として、以下の評価に用いた。

## (2)LaminA/C 遺伝子機能抑制細胞株の評価

### 1. RNA 調製 :

10 31 種類の Lamin A/C 遺伝子機能抑制細胞株を培養した 10 cm ディッシュを、各々 PBS で二回洗浄後、ディッシュあたり 3ml の TRIZOL 試薬 (Invitrogen 社製) を加えて細胞を溶解した。溶解した細胞液を各々 15ml の別々の遠心チューブに移した後、各々 0.2ml のクロロホルムを加えて激しく混合した後、室温で 3 分間静置し、4℃、3000 rpm で 40 分間遠心分離を行った。水相 (一番  
15 上の部分) を各々新しいチューブに移した後、0.5ml のイソプロパノールを加えて混合し、5~10 分間室温で静置した。4℃、3000 rpm で 40 分間遠心分離を行い、RNA 沈殿とし、70%エタノールで一度洗浄した後、DW に溶解した。各試料の吸光度 260nm を DU650 (ベックマン社製) で測定し、測定値をもとに RNA 濃度を算出し、ノザン解析に使用した。

20

### 2. 蛋白質調製 :

31 種類の Lamin A/C 遺伝子機能抑制細胞株を培養した 10 cm ディッシュを、各々 PBS で洗浄後、トリプシン EDTA 溶液 (Invitrogen 社製) で細胞を剥がして回収した。回収後の細胞を更に PBS で洗浄後、5000 rpm、5 分間の微量遠  
25 心で細胞を回収した。回収した細胞を boiling lysis buffer (5% SDS, 5mM sodium ortho-vanadate, 50mM Tris pH7.4) に溶解した後、100℃で 5 分間処理し、直後に氷冷した。15000rpm、4℃で 20 分間遠心分離を行い、その上清を回収して蛋白質溶液とした。蛋白質溶液は蒸留水を用いて 10 倍希釈した後、総タンパク濃度を測定した。GENios (TECAN 社製) を用いて、Advanced Protein

Assay Reagent 試薬 (cytoskeleton 社製) で反応後の希釈蛋白質溶液の吸光度を測定した。BSA を標準品として測定値を補正し、最終的に  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  の濃度に調製してサンプルとした

### 5 3. ノザンハイブリダイゼーションによる Lamin A/C mRNA 発現解析:

上記 1. で調製した RNA を用いて LaminA/C mRNA 発現解析を行った。

#### Lamin A/C mRNA 発現解析

20  $\mu\text{g}$  の total RNA を変性アガロースゲルで泳動して分離した後に、Hybond-N+ membrane (Amersham Pharmacia Biotech) へキャピラリーブロッティング法により転写した。さらに UV クロスリンク法によって RNA をメンブレンに架橋した。メンブレンは prehybridization 溶液 (50% ホルムアミド,  $5\times\text{SSPE}$ ,  $2\times\text{Denhardt's solution}$ , 0.1% SDS,  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  denatured サケ精子 DNA) にて、42°C、1 時間処理した後に、 $^{32}\text{P}$  dCTP でアイソトープラベルした lamin A/C 遺伝子断片 をプローブとして用いて一晩 hybridize した。メンブレンの洗浄は  $2\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$  溶液によって室温にて 5 分間行い、この操作を 3 回繰り返した。その後 50°C で 10 分、65°C で 10 分 2 回洗浄を行った。洗浄が終わったメンブレンは X 線フィルムによって一晩露光した。

結果を図 2 に示す。Lamin A/C 遺伝子機能抑制細胞株では、ベクター未導入細胞株と比べて Lamin A/C mRNA の発現が抑制されており、Lamin A/C 遺伝子機能抑制ベクターが、遺伝子特異的に RNA 機能抑制活性を有することが明らかとなった。

### 4. ウェスタン法による解析:

上記 2. で濃度調製した蛋白質サンプルを、SDS buffer を用いて 2 倍希釈した。その  $6 \mu\text{L}$  を 13% SDS アクリルアミドゲルに重層し、300V, 40mA の条件で 80 分間 SDS PAGE を行った。セミドライブロッティング装置を使用して、泳動したゲルから、300V, 140mA, 60min の条件で蛋白質をニトロセルロース膜 (BIORAD 社) に転写した。蛋白質をプロットしたニトロセルロース膜は、1000 倍希釈した抗 LaminA/C 抗体 (BD バイオサイエンス社製)、またはコントロール抗体 ( $\alpha$

Tubulin 抗体、Zymed Laboratories 社) で処理後、引き続き HRP 標識ヤギ Anti mouse IgG 抗体で反応した。Lamin A/C 特異的バンドの検出は、抗原抗体反応後のニトロセルロース膜を ECL western blotting detection reagent (Amersham Bioscience 社) で反応後、X 線フィルムに露光することにより行った。

- 5 結果を図 2 に示す。各サンプルより検出されたバンドの濃度は、ノザン解析による Lamin A/C の mRNA の濃度とほぼ一致し、mRNA だけでなく翻訳後のタンパク質においても抑制効果を有することが明らかとなった。

実施例 4. ホタルルシフェラーゼ遺伝子機能抑制ベクターの RNA 機能抑制効果

- 10 本実施例においては、標的遺伝子をホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Genbank Accession No. 47296) の配列位置 357-381 に相当する 25 ヌクレオチドの配列を RNA インターフェアランスの標的部位として、標的遺伝子用ポリヌクレオチドを細胞内で発現するホタルルシフェラーゼ遺伝子機能抑制ベクターを作製し、その RNA 機能抑制効果を評価した。

15

ホタルルシフェラーゼ遺伝子機能抑制ベクター作製: U6 プロモーターおよび H1 プロモーター制御下で、ホタルルシフェラーゼ遺伝子機能抑制ポリヌクレオチドを発現するベクター二種類 (U6H1 25stem- Luc、及び U6H1 25stemloop- Luc)、およびホタルルシフェラーゼ遺伝子に対する配列を含まないコントロー

- 20 ルベクターを構築した。

コントロールベクター

- 実施例 3 で作製した pUC19U6 を制限酵素 EcoRI 及び SalI で切断し、ヒト U6 プロモーターを単離し、その断片を EcoRI 及び SalI で切断した pBS ベクターへク  
25 ローニングした (pBSU6)。つぎに実施例 3 で作製した pUC19H1 ベクターより以下のプライマー (オリゴマー 1 及び 2) で PCR により増幅して、マウス H1 プロモーターを単離し、その増幅断片を SacI 及び SpeI で切断し、SacI 及び SpeI で切断した pBSU6 へクローニングし、コントロールベクターとした  
オリゴマー名 1: biH1pro. SacI 配列番号 16



TTTTTGAGCTCATGCAAATTACGCGCTGTG

オリゴマー名 2 : biH1pro. SpeI-2 配列番号 17

TTTTTACTAGTTGGTCTAGACCGGCCGCCAC

5

Luciferase 遺伝子 RNA 機能抑制ベクター

1. U6H1 25stem- Luc

配列番号 18、19 の下記のオリゴマー1 及びオリゴマー2 をアニーリングさせた後、制限酵素 *Csp45I* 及び *XbaI* で切断したコントロールベクターにクローニングした。

オリゴマー名 1 配列番号 18 : 25s#4F 枠内 ; *Csp45I* 切断末端、下線 stem 領域

CGAAAAAAAGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCTTTTGGT

15 オリゴマー名 2 配列番号 19 : 25s#4R 枠内 ; *XbaI* 切断末端、下線 stem 領域

CTAGACCAAAAAGGCGTATCTCTTCATAGCCTTATGCTTTTTT

2. U6H1 25stemloop- Luc

配列番号 20、21 の下記のオリゴマー1 およびオリゴマー2 をアニーリングさせた後、Ex-Taq を用いて DNA 合成を行い、double strand oligo を合成した。合成した double strand oligo を制限酵素 *Csp45I* および *XbaI* で切断して、*Csp45I* 及び *XbaI* で切断した pBSU6 へクローニングした。

オリゴマー名 1 ; ST-UHGL3#4F 配列番号 20 ; 枠内 ; *Csp45I* 切断部位、下線 ; stem 領域、斜体 ; loop 領域

TGGAAGTTCGAAAAAAAGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCTTAAGCGT

(鎖長 52mer)

オリゴマー名 2 配列番号 2 1 ; ST-UHGL3#4R 枠内 ; *Xba*I 切断部位、下線 ; stem 領域、斜体 ; loop 領域

CACGGGCTCTAGACCAAAAAGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCTTAAAGCGT

(鎖長 53mer)

5

1. トランスフェクション複合体の調製: 1.8  $\mu$ g の pGL3 コントロールベクター (Invitrogen 社製)、0.2  $\mu$ g の pRL/TK ベクター (Invitrogen 社製)、及び上記 1 で得られた RNAi 誘導ベクターの 20  $\mu$ g を 200  $\mu$ l の OPTI-MEM (Invitrogen 社製) に加えた (A 液)。A 液は、RNAi 誘導ベクターとコントロールベクターの計 3 種類の各々について、別個に調製した。別に、12  $\mu$ l のリポフェクタミン 2000 (Invitrogen 社製) を 200  $\mu$ l の OPTI-MEM に加えて混合し、5 分間室温で静置したものを 3 本調製した (B 液)。A 液と B 液を混合し、20 分間室温で反応して、トランスフェクション複合体 (3 種類) を調製した。
- 15 2. トランスフェクション: トランスフェクション前日に、10% の FBS を添加した DMEM 培地 (シグマ社製) を用いて、HeLa S3 細胞の  $10^5$ /ml 溶液を調製し、24 穴プレートの一ウエル当たり 0.5ml ずつ加えた。CO<sub>2</sub> 培養器 (サンヨー社製) にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で一晩前培養を行った。上記 2 で調製したトランスフェクション複合体の 3 種類を、24 穴プレートの一ウエル当たり 100  $\mu$ l ずつ (一種について 4 つのウエル ; n = 4) 別のウエルに加えた後、培養プレートを CO<sub>2</sub> 培養器に戻し、引き続き 1 日間培養を行った。
- 20 3. ルシフェラーゼアッセイ: デュアル ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイ・システム (Dual Luciferase reporter assay system、プロメガ社製) を用い、操作はこのキットに添付のプロトコールに準じた。培養プレートより培地を吸引除去し、細胞を PBS で一度洗浄した。キットに添付の溶解液を 0.2ml/ウエルで添加し、細胞を溶解させた後、溶解液の 20  $\mu$ l を添付の反応試薬 LARIII100  $\mu$ l と混合し、GENios (TECAN 社製) の発光測定プログラムを用いてホタルルシフェラーゼの活性を測定した。引き続き、Stop & Gro 試薬を 100  $\mu$ l 加えた後、ウミシイタケルシフェラーゼの活性を GENios

の発光測定プログラムにて測定した。ホタルルシフェラーゼの測定値をウミシイタケルシフェラーゼの測定値で割った値を算出後、コントロールベクターで得られた値を 100 として、各々相対値を算出した。

4. 解析結果： 結果は図 3 に示す。それぞれの RNAi 誘導ベクターで処理した  
5 場合、コントロールベクターで処理した場合のルシフェラーゼ発現量を  
100 として、U6H1 25stem- Luc では 32.8%、U6H1 25stemloop- Luc では  
16.0%に減少した。いずれの機能抑制ベクターを用いた場合にも、ルシフェ  
ラーゼ活性を抑制することが判明した。 図 3 の結果から、本発明の機能抑  
10 制ベクターにより、標的遺伝子であるルシフェラーゼの活性が効果的に抑制  
されており、RNA 機能抑制活性を有することが確認された。

## 請求の範囲

1. 連続する(I)+(I I)+(I I I)のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列からなる標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列であって、標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列はコンポーネント(I)または  
5 (I I I)のいずれか又はその部分配列に相補する配列を有するRNAに対してRNA機能抑制活性を有する、  
但し、コンポーネント(I I I)は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する1  
5 ~ 30のポリヌクレオチド配列を含み、  
コンポーネント(I I)は、0塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列（但  
10 し、0塩基は結合を表す）、または非ヌクレオチド配列であり、  
コンポーネント(I)は、コンポーネント(I I I)に相補的な配列を含むポリ  
ヌクレオチド配列である。
2. 前記コンポーネント(I I I)のポリヌクレオチド配列がDNAまたはRNAを含むものであることを特徴とする請求項1に記載のポリヌクレオチド配列。
- 15 3. コンポーネント(I)または(I I I)が1から数塩基のU、T、G、CまたはAからなる配列を少なくとも何れかの末端にさらに有するか、相補的配列の内部において欠失、置換又は付加していることを特徴とする請求項1に記載のポリ  
ヌクレオチド配列。
4. ポリヌクレオチド配列が化学的合成法または遺伝子組換え技術によって得  
20 られることを特徴とする請求項1に記載のポリヌクレオチド配列。
5. 配列番号1または2の一本鎖RNAからなる標的遺伝子用ポリヌクレオチ  
ド配列。
6. コンポーネント(I I)がヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列の  
いずれか、またはそれらの組み合わせによってなる請求項1に記載のポリヌクレ  
25 オチド配列。
7. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列が1塩基以上10キロ塩基未満  
のヌクレオチド配列からなる請求項6に記載のポリヌクレオチド配列。
8. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列が1塩基長から数百塩基長のヌ  
クレオチド配列からなる請求項7に記載のポリヌクレオチド配列。

9. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列が1塩基長から数十塩基長のヌクレオチド配列からなる請求項8に記載のポリヌクレオチド配列。
10. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列が1塩基長から20塩基長のヌクレオチド配列からなる請求項9に記載のポリヌクレオチド配列。
- 5 11. コンポーネント(I I)が配列番号3または4に示されることを特徴とする請求項10に記載のポリヌクレオチド配列。
12. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列または非ヌクレオチド配列が、PNA、細胞質移行性配列、デコイ活性を有する配列、インターフェロン誘導抑制配列、RNAse抑制活性、アンチセンス活性、リボザイム活性およびトラン
- 10 スファーRNAのいずれかを有する配列、またはそれらの組み合わせによってなる請求項1に記載のポリヌクレオチド配列。
13. 化学的合成法または遺伝子組換え技術によって請求項1～12のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列を製造する方法。
14. 請求項1～12のいずれかに記載の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列
- 15 がベクターに挿入された組換えベクター。
15. 請求項1～12のいずれかに記載の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列をベクターに挿入することを特徴とする請求項14の組換えベクターの製造方法。
16. 請求項1～12の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を用いて、医薬品標的遺伝子をスクリーニングする方法において、
- 20 該方法は連続する(I)+(I I)+(I I I)のコンポーネントからなる単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を細胞または組織に導入し、前記(I)または(I I I)のコンポーネントのポリヌクレオチド配列と相補する配列を有する遺伝子の、一本鎖ポリヌクレオチド配列によるRNA機能抑制活性の増減によって標的遺伝子の関連する機能を刺激または抑制する化合物を同定するため
- 25 のスクリーニング法であって、
- (a) 候補化合物と、該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物（または該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物を担持している細胞

もしくはその膜) またはその融合タンパク質との結合を、該候補化合物に直接的または間接的に結合させた標識により測定する方法、

(b) 候補化合物と、該一本鎖ポリヌクレオチド配列が導入された細胞 (または該一本鎖ポリヌクレオチド配列を担持している細胞もしくはその膜) またはその

5 融合物との結合を、標識競合物質の存在下で測定する方法、

(c) 候補化合物が該一本鎖ポリヌクレオチド配列により、標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは該標的遺伝子発現産物の活性化または抑制により生ずるシグナルをもたらすか否かを、前記ポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物を担持している細胞または細胞膜に適した検出系を用いて調

10 べる方法、

(d) 候補化合物と、標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドまたは標的遺伝子発現産物を含有する溶液とを同時に混合して混合物を調製し、該混合物中の該ポリペプチドまたは該標的遺伝子発現産物の活性を測定し、該混合物の活性をスタンダードと比較する方法、および

15 (e) 候補化合物が細胞における該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドをコードする mRNA および該標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列のポリペプチドの産生に及ぼす効果を検出する方法  
よりなる群から選択される方法のいずれかを用いることを特徴とする医薬品標的遺伝子をスクリーニングする方法。

20 17. 請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列を有効成分とする医薬組成物。

18. 請求項 14 の組換えベクターを有効成分とする医薬組成物。

19. 連続する (I) + (I I) + (I I I) のコンポーネントを有する単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を細胞または組織に導入し、前記 (I) ま

25 たは (I I I) のコンポーネントのポリヌクレオチド配列と相補する配列を有する遺伝子の RNA 機能抑制活性によって標的遺伝子の機能を抑制する方法

但し、コンポーネント (I I I) は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する 15 ~ 30 のポリヌクレオチド配列を含み、

コンポーネント(I I)は、0塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列（但し、0塩基は結合を表す）、または非ヌクレオチド配列であり、

コンポーネント(I)は、コンポーネント(I I I)に相補的な配列を含むポリヌクレオチド配列である。

- 5 20. コンポーネント(I I I)のポリヌクレオチドからなるヌクレオチド配列がDNAまたはRNAを含むものであることを特徴とする請求項19に記載の方法。
21. コンポーネント(I)または(I I I)が1から数塩基のU、T、G、CまたはA配列の何れかの末端に有するか、内部において欠失、置換又は付加しているDNAまたはRNAであることを特徴とする請求項19に記載の方法。
22. ポリヌクレオチド配列が化学的合成法または遺伝子組換え技術によって得られたものであることを特徴とする請求項19に記載の方法。
23. 一本鎖ポリヌクレオチド配列が配列番号1または2の一本鎖RNAからなる請求項19に記載の方法。
- 15 24. コンポーネント(I I)がヌクレオチド配列、または非ヌクレオチド配列のいずれか、またはそれらの組み合わせによってなる請求項19に記載の方法。
25. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列が1塩基以上10キロ塩基未満のヌクレオチド配列からなる請求項24に記載の方法。
26. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列が1塩基長から数百塩基長の  
20 ヌクレオチド配列からなる請求項25に記載の方法。
27. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列が1塩基長から数十塩基長のヌクレオチド配列からなる請求項26に記載の方法。
28. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列が1塩基長から20塩基長のヌクレオチド配列からなる請求項27に記載の方法。
- 25 29. コンポーネント(I I)が配列番号3または4に示されるものであることを特徴とする請求項28に記載の方法。
30. コンポーネント(I I)のヌクレオチド配列または非ヌクレオチド配列が、PNA、細胞質移行性配列、デコイ活性を有する配列、インターフェロン誘導抑制配列、RNase抑制活性、アンチセンス活性、リボザイム活性およびトラン

スファーRNAのいずれかを有する配列、またはそれらの組み合わせによってなる請求項18に記載の方法。

31. 請求項19～30に記載の標的遺伝子の機能を抑制する方法によって、標的遺伝子のタンパク質の発現を抑制する方法。

5 32. 請求項19～30に記載の標的遺伝子の機能を抑制する方法によって、標的遺伝子の転写物の活性を抑制する方法。

33. 請求項31または32の方法によって、産生した培養されたノックダウン細胞または組織または非ヒトノックダウン動物又はノックダウン植物。

34. 臓器移植用である請求項33に記載のノックダウン細胞または組織また  
10 は非ヒトノックダウン動物。

35. 請求項17または18に記載の医薬組成物からなる遺伝子治療剤。

36. 連続する(I)+(II)+(III)のコンポーネントを有する単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を細胞または組織または非動物又は植物に導入し、前記(I)または(III)のコンポーネントのポリヌクレオチド配列と  
15 相補する配列を有する遺伝子のRNA機能抑制活性を有することによって標的遺伝子の機能を試験する方法

但し、コンポーネント(III)は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する15～30のポリヌクレオチド配列を含み、

コンポーネント(II)は、0塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列（但  
20 し、0塩基は結合を表す）、または非ヌクレオチド配列であり、

コンポーネント(I)は、コンポーネント(III)に相補的な配列を含むポリヌクレオチド配列である。

37. 被検化合物を細胞または組織または非ヒト動物又は植物と共に培養した後、該細胞または組織または非ヒト動物又は植物に対して、連続する(I)+(II)+(III)のコンポーネントを有する単離または精製された一本鎖ポリヌクレオチド配列を導入する工程、前記(I)または(III)のポリヌクレオチド配列と相補する配列を有する遺伝子のRNAのRNA機能抑制活性をコントロールと比較する工程を包含する標的遺伝子の機能を増強する候補化合物を検出する方法  
25



但し、コンポーネント(III)は標的遺伝子に相補的配列を有する連続する15～30のポリヌクレオチド配列を含み、

コンポーネント(II)は、0塩基から10キロ塩基長のヌクレオチド配列（但し、0塩基は結合を表す）、または非ヌクレオチド配列であり、

5    コンポーネント(I)は、コンポーネント(III)に相補的な配列を含むポリヌクレオチド配列である。

38.    コンポーネント(III)が標的遺伝子に相補的な18～25個のリボヌクレオチドに続く任意の種類1～5個のリボヌクレオチドからなり、コンポーネント(I)がコンポーネント(III)の18～25個のヌクレオチドに相補的な18～25個のリボヌクレオチドからなる請求項1～4のいずれかに記載の、  
10    標的遺伝子用ポリヌクレオチド配列。

39.    以下の工程を含む標的遺伝子用ヌクレオチドの合成方法：

- (i)    コンポーネント(II)の3'末端の数ヌクレオチドがコンポーネント  
         (I)または(II)の数ヌクレオチドに相補的になるようにコンポーネ  
15    ント(I)および(II)からなる一本鎖ヌクレオチドを作製する工程、
- (ii)    このコンポーネント(I)および(II)からなる一本鎖ヌクレオチドを用いてヌクレオチド合成酵素活性によりコンポーネント(III)を合成させる工程、またはこのコンポーネント(I)および(II)からなる一本鎖ヌクレオチドを用いて細胞内に導入し細胞内に存在する上記ヌクレオ  
20    チド合成酵素活性によりコンポーネント(III)を合成させる工程。

40.    コンポーネント(I)および(III)がランダムなオリゴヌクレオチドである請求項39の方法により得られたランダム化標的遺伝子用ヌクレオチド。

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 8 月 28 日 (28.08.2003)

PCT

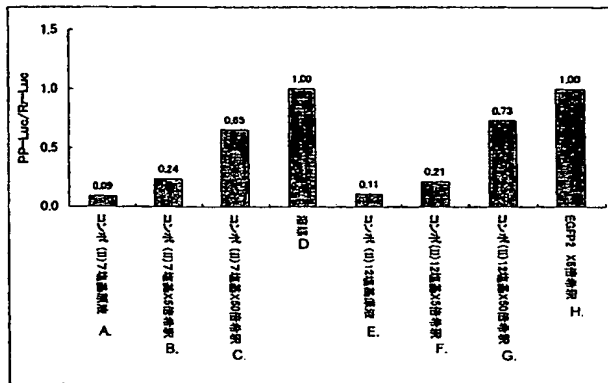
(10) 国際公開番号  
WO 03/070932 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/00, 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/50, 33/15, A61K 31/7105, 38/00, A01K 67/027, A01H 5/00, C12N 5/10 // (C12R 1/91)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/01913
- (22) 国際出願日: 2003 年 2 月 21 日 (21.02.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-46889 2002 年 2 月 22 日 (22.02.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8535 東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 幹生 (SUZUKI, Mikio) [JP/JP]; 〒771-0125 徳島県徳島市川内町金岡 4 0 番地の 1 Tokushima (JP). 百田 裕 (MOTOTA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒771-0219 徳島県板野郡松茂町笹木野字山南 1 6 番地の 3 2 Tokushima (JP). 渡邊 武 (WATANABE, Takeshi) [JP/JP]; 〒770-0941 徳島県徳島市万代町 5 丁目 5 3 番地の 1 Tokushima (JP).
- (74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).

[続葉有]

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE FOR TARGET GENE

(54) 発明の名称: 標的遺伝子用ポリヌクレオチド



A...COMPO (II) 7-BASES STOCK SOLUTION  
B...COMPO (II) 7-BASES 5-FOLD DILUTION  
C...COMPO (II) 7-BASES 50-FOLD DILUTION  
D...SOLVENT  
E...COMPO (II) 12-BASES STOCK SOLUTION  
F...COMPO (II) 12-BASES 5-FOLD DILUTION  
G...COMPO (II) 12-BASES 50-FOLD DILUTION  
H...EGFP2 5-FOLD DILUTION

(57) Abstract: It is intended to provide a single-stranded polynucleotide sequence which comprises a nucleic acid sequence of a complementary strand to the target gene and component sequences.

(57) 要約:

本発明は、標的遺伝子と相補鎖核酸配列とコンポーネント配列からなる一本鎖ポリヌクレオチド配列を提供する。

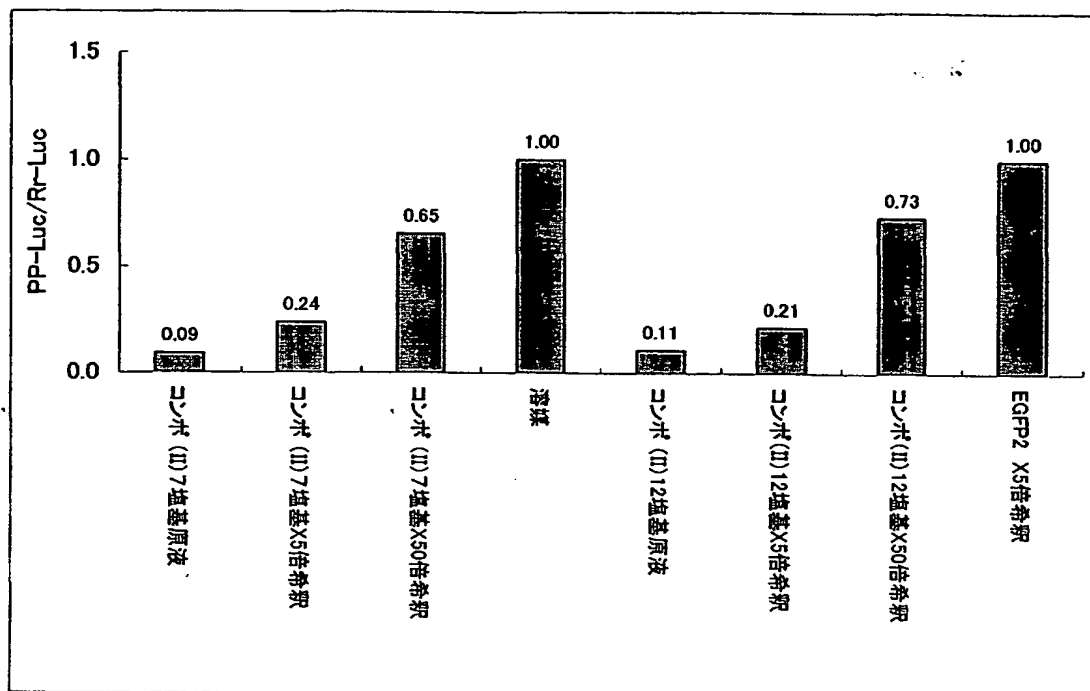
WO 03/070932 A1

WO 03/070932 A1



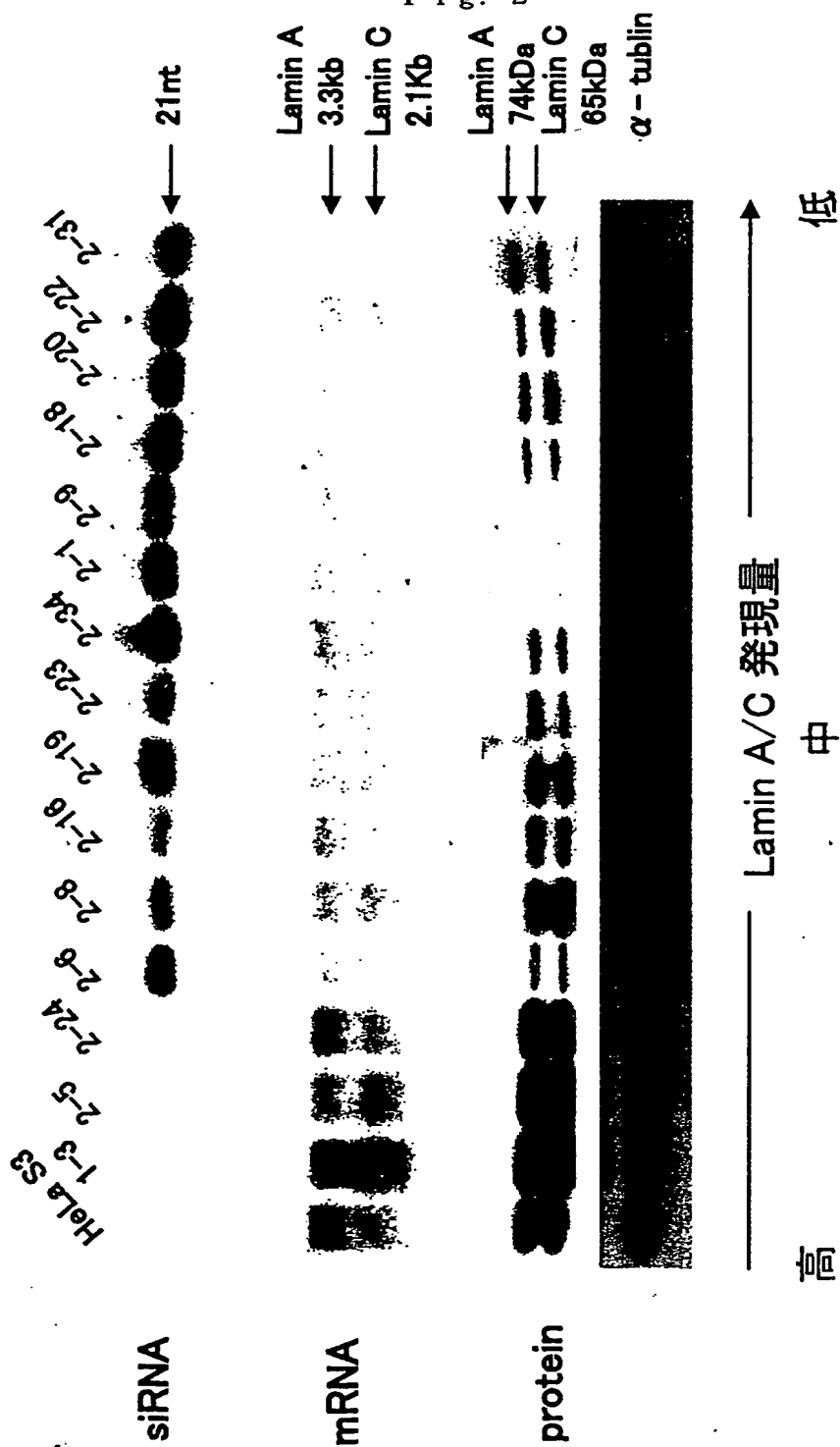
添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

1 / 3  
Fig. 1

2/3

Fig. 2



3/3

Fig. 3

